

# DISSERTATION

**Strukturelle Einblicke in die Funktionalität des Terminase-Proteins pUL89, eine Untereinheit des Nanomotors des humanen Cytomegalievirus (HCMV).**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.).

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

**M. Sc. Janine Theiß**

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der

Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann

2. Prof. Dr. Elke Bogner

3. Prof. Dr. Christian Sinzger

Datum der Promotion: 28.09.2020

*Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.*

***Isaac Newton***

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	XI
SUMMARY	XII
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Humanes Cytomegalievirus und Herpesviren	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Aufbau von HCMV	4
1.4 Viraler Replikationszyklus	6
1.5 DNA-Verpackungsmechanismus von HCMV	8
1.5.1 Portalprotein pUL104	9
1.5.2 Nuklease pUL89	10
1.5.3 ATPase pUL56	10
<b>2. PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>12</b>
3.1 Materialien	12
3.1.1 Zelllinien	12
3.1.2 Virusstamm HCMV TB40/E	12
3.1.3 Bakterienstämme	13
3.1.4 Plasmidkonstrukte	13
3.1.5 Sequenzierung-Oligonukleotide	20
3.1.6 Antikörper	21

## Inhaltsverzeichnis

3.1.7	Enzyme, Standardmarker und Kits	22
3.1.8	Chemikalien	24
3.1.9	Verbrauchsmaterialien	24
3.1.10	Geräte und Hilfsmittel	24
3.1.11	Software	26
3.1.12	Kulturmedien	27
3.1.13	2-Bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole (BDCRB)	28
3.2	Methoden	29
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.3	Immunbiologische Methoden	50
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden	52
3.2.5	Elektronenmikroskopie	62
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>64</b>
4.1	<i>In silico</i> Analyse der HCMV Nuklease pUL89	64
4.1.1	Identifizierung und Analyse potenziell DNA-bindender Aminosäuren mit Hilfe bioinformatischen Programme	64
4.1.2	Strukturelle Analyse mit <i>Phyre2</i>	67
4.1.3	Konstruktion der Proteinaustausch-Mutanten von pUL89	68
4.1.4	Sequenzvergleich mit <i>MEGA7</i>	69
4.2	Validierung des Maus-Antikörper gegen das HCMV Terminase-Protein pUL89 ( $\alpha$ -pUL89)	70
4.3	<i>In vitro</i> Charakterisierung funktioneller Domänen der Terminase-Untereinheit pUL89	72
4.3.1	Native Reinigung von pUL89 und pUL89-sub aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen	72
4.3.2	Charakterisierung der Nuklease-Aktivität von pUL89 und pUL89-sub	74

## Inhaltsverzeichnis

4.3.3 Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften der Terminase-Untereinheit pUL89 oder pUL89-sub	79
4.4 Klonierung von rekombinanten BAC-Mutanten ( <i>bacterial arteficial chromosomes</i> ) mit Hilfe der <i>En Passant</i> Mutagenese	81
4.4.1 Charakterisierung der Histidin-Virusmutanten	82
4.4.2 Rekonstitution der wachstums-defiziten BAC-Mutanten TB40/E_UL89E534A, TB40/E_UL89R544A und TB40/E_UL89E534A, R544A	94
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>99</b>
5.1 Struktur von pUL89	100
5.2 <i>In vitro</i> Identifizierung funktioneller Domänen	103
5.2.1 Nuklease-Domäne von pUL89	103
5.2.2 DNA-Bindedomäne von pUL89	107
5.3 Rekonstitution von rekombinanten HCMV in bakteriellen artifiziiellen Chromosomen	109
5.3.1 Rekonstitution und Charakterisierung der rekombinanten Viren TB40/E_UL89H565A, TB40/E_UL89H571A und TB40/E_UL89H565A, H571A	110
5.3.2 Rekonstitutionsversuche der wachstums-defiziten BAC-Mutanten TB40/E_UL89E534A, TB40/E_UL89R544A und TB40/E_UL89E534A, R544A	114
<b>6. AUSBLICK</b>	<b>116</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>XIII</b>
<b>ANHANG</b>	<b>XXV</b>
<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>XXVII</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>XXVIII</b>
<b>EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>XXIX</b>

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Genomorganisation von HCMV. _____	4
Abbildung 2: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung des humanen Cytomegalievirus. _____	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des DNA-Verpackungsmechanismus von HCMV. _____	8
Abbildung 4: Genkarte des eukaryotischen Klonierungsvektor pcDNA3.1/His <sup>®</sup> B (Invitrogen, Karlsruhe). _____	14
Abbildung 5: Genkarte des Plasmids pcDNA-89. _____	15
Abbildung 6: Genkarte des Plasmids pEPkan-S <sup>76</sup> . Das Plasmid weist ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen auf und diente als PCR-Template für die En Passant Mutagenese. _____	16
Abbildung 7: Genkarte des Lentivirus-Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-puro. _____	17
Abbildung 8: Genkarte des Lentivektors mit inserierter UL89-Sequenz in der MCS und viralem Promotor anstatt des CMV-Promotors. _____	18
Abbildung 9: Genkarte des Verpackungsplasmids psPAX2. _____	19
Abbildung 10: Genkarte des Hüllplasmids pMD2.G. _____	20
Abbildung 11: Identifizierte potenzielle HTH-Motive in pUL89. _____	66
Abbildung 12: Vergleich der vorhergesagten Struktur von pUL89 mit homologen Proteinen. _____	67
Abbildung 13: Analyse der pUL89-Sekundärstruktur mit PSIPRED. _____	69
Abbildung 14: Sequenzvergleich von HCMV pUL89 mit homologen Proteinen. _____	70
Abbildung 15: Darstellung der Validierung von $\alpha$ -pUL89. _____	71
Abbildung 16: Analyse der nativen Reinigung von pUL89 aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen. _____	73
Abbildung 17: Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89. _____	75
Abbildung 18: Inhibierung der Nuklease-Aktivität und Vergleich mit dem N Protein (Hantavirus, Sangassou). _____	77
Abbildung 19: Nuklease-Aktivität der Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub) im Vergleich zum Wildtyp-Protein pUL89. _____	78

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Untersuchung der dsDNA-Bindungseigenschaften von pUL89 und pUL89-sub. _____	80
Abbildung 21: Sequenzvergleich des Wildtyp-BAC TB40/E BAC 4 und der erstellten rekombinanten BAC-Mutanten. _____	81
Abbildung 22: Überprüfung der Mutagenese-Region im UL89-Exon 2 der rekombinanten Viren der Passage 6. _____	83
Abbildung 23: Wachstumskinetik der rekombinanten Histidin-Virusmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E. _____	84
Abbildung 24: Analyse der viralen Proteinexpression der Histidin-Virusmutanten. _	86
Abbildung 25: Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz der Histidin-Virusmutanten. _____	87
Abbildung 26: Lokalisation von pUL89 im Wildtyp-Virus TB40/E und den Histidin-Virusmutanten. _____	88
Abbildung 27 Analyse der Nuklease-Eigenschaften von pUL89 in rekombinanten Viren mit Hilfe einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). _____	90
Abbildung 28: Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von Kernextrakten infizierte HELF Fi301-Zellen. _____	91
Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Wildtyp-Virus TB40/E. __	93
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Histidin-Virusmutanten TB40/E_UL89H565A, TB40/E_UL89H571A und TB40/E_UL89H565A, H571A. __	94
Abbildung 31: Nachweis der viralen Proteinexpression in den wachstums-defiziten BAC-Mutanten TB40/E_UL89E534A, TB40/E_UL89R544A und TB40/E_UL89E534A, R544A. _____	95
Abbildung 32: Nachweis der pUL89-Expression in verschiedenen Zelllinien. _____	97
Abbildung 33: 3D-Rekonstitution der Struktur von pUL89 durch Einzelpartikel-Analyse. _____	101
Abbildung 34: Ribbon-Model der Struktur und Koordinierung der zweiwertigen Kationen in der Nuklease-Domäne pUL89-C. _____	106
Abbildung 35: Modellierte Struktur der DNA-Bindedomäne von pUL89. _____	108

### TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide. ____	21
Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. _	21
Tabelle 3: Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel. _____	24
Tabelle 4: Zusammenfassung der verwendeten Software. _____	26
Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese. _____	29
Tabelle 6: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die ortsgerichtete Mutagenese. _____	30
Tabelle 7: Thermocycler-Einstellungen für die ortsgerichtete Mutagenese-PCR. ____	30
Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide für En Passant Mutagenese. _____	33
Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die En Passant Mutagenese.	35
Tabelle 10: Thermocycler-Einstellungen für die En Passant Mutagenese. _____	35
Tabelle 11: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Überprüfung der Kanamycin-Resistenzgen-Integration. _____	36
Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Überprüfung der Kanamycin-Resistenzgen-Integration. _____	36
Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für Herstellung einer komplementierenden Zelllinie. _____	39
Tabelle 14: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung des UL89-Gens. _____	39
Tabelle 15: PCR-Bedingungen für die Amplifizierung des UL89-Gens. _____	39
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ligationsansätze. _____	40
Tabelle 17: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der Promotorregion von UL89. _____	41
Tabelle 18: PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der Promotorregion. _____	41
Tabelle 19: Zusammenfassung der verwendeten Ligationsansätze. _____	41
Tabelle 20: Gelkomponenten für ein SDS-Gel. _____	56



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 21: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide in der Kolorimetrischen Untersuchung. _____	59
Tabelle 22: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes. _____	59
Tabelle 23: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen. _____	59
Tabelle 24: Zusammenfassung der identifizierten DNA-bindenden Regionen (DBR) in pUL89 durch das Programm DP-Bind. _____	65
Tabelle 25: Potenziell-funktionelle Aminosäuren von pUL89. _____	68
Tabelle 26: Zusammenfassung des IUPAC Nukleotid-Codes _____	XXV
Tabelle 27: Ergebnisse der NGS-Analyse der Intron-Region zwischen US34A und RL1. _____	XXV

## Abkürzungsverzeichnis

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Aminosäure ( <i>amino acid</i> )
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BDCRB	<i>2-Bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	kodierende DNA ( <i>coding DNA</i> )
cccDNA	kovalent-geschlossene, zirkuläre DNA ( <i>covalently closed circular DNA</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE	cytopathischen Effekt
Da	Dalton
dATP	Desosoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DBR	DNA-bindende Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Gen	<i>early Gen</i>
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
fw	<i>forward</i>
x g	Fallbeschleunigung (SI: m/ s <sup>2</sup> )
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

gC	Glykoproteinkomplex
h	Stunde
h p.i.	<i>(hours post infection)</i>
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HEK	humane embryonale Nierenzelle ( <i>human embryonic kidney cell</i> )
HHV	humanes Herpesvirus
His-Tag	Histidin-Tag
HSV	Herpes-simplex-Virus
IE Gen	<i>immediate early</i> Gen
IgG	Immunglobulin G
IMAC	immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IR	<i>internal repeats</i>
k	Kilo
LB	<i>lysogeny broth</i>
L Gen	<i>late</i> Gen
l	Liter
L-S	<i>long-short</i>
m	milli
m	Meter
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>Multiple Cloning Site</i> )
MIE	<i>major immediate-early</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Nano
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
p	pico
<i>pac</i>	<i>packaging</i>

## Abkürzungsverzeichnis

pAP	<i>assembly protein precursor</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pPR	<i>proteinase precursor</i>
RCMV	Ratten-Cytomegalievirus
RNA	Ribonukleinsäure
rv	<i>revers</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
T/ E	Trypsin/ EDTA
TR	<i>terminale repeats</i>
T7	<i>type 7</i>
UL	<i>unique long</i>
U/ min	Umdrehungen pro Minute
US	<i>unique short</i>
V	Volt
VZV	Varizella-Zoster-Virus
μ	Mikro
°C	Grad Celsius
Ω	Ohm

### Zusammenfassung

Der DNA-Verpackungsmechanismus des humanen Cytomegalievirus (HCMV) ist charakteristisch für große DNA-Viren wie Herpesviren und ds-Bakteriophagen. Er beruht auf der Spaltung der konkatemeren DNA durch einen viralen, hetero-oligomeren Proteinkomplex, der Terminase. Die Terminase von HCMV besteht aus den Proteinen pUL89, pUL56 und pUL51. Zusammen mit dem Portalprotein bildet die Terminase den Nanomotor von HCMV.

In der vorliegenden Arbeit konnten die funktionellen Domänen der Terminase-Untereinheit pUL89 *in vitro* identifiziert und charakterisiert werden. Neben einer Nuklease-Aktivität besitzt pUL89 auch die Fähigkeit dsDNA sequenz-unabhängig zu binden. Durch Nuklease-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass pUL89 sowohl dsDNA, als auch lineare DNA spaltet. PUL89 weist dabei eine größere Spezifität zu dsDNA auf. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäure D463 eine zentrale Funktion innerhalb der Nuklease-Aktivität besitzt. Durch kolorimetrische DNA-Bindungsuntersuchungen konnte die Aminosäure R544 als essenziell für die dsDNA-Bindungsfähigkeit von pUL89 identifiziert werden.

Basierend auf den *in vitro* Ergebnissen wurden rekombinanten TB40/E-Virusmutanten mit Mutationen im ORF *UL89* durch die *En Passant* Mutagenese generiert. Mit Hilfe dieser Viren sollte der Einfluss der Mutationen auf die Replikation des Virus charakterisiert werden. Es war möglich nachzuweisen, dass die Aminosäuren E534 und R544 eine essenzielle Aufgabe innerhalb von HCMV erfüllen, da die Mutation einer dieser Aminosäure zu nicht wachstums-fähigen BAC-Mutanten führte. Zur Charakterisierung dieser Konstrukte wurden die Zelllinien HELF Fi301-UL89 und HELF Fi301-vProm-UL89 verwendet. Durch Untersuchungen hinsichtlich der Wachstumseigenschaften, Proteinexpression, DNA-Spaltung, DNA-Bindung sowie elektronenmikroskopischen Aufnahmen, konnte gezeigt werden, dass die wachstums-kompetenten BAC-Mutanten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-Virus TB40/E zeigten. Sodass nachgewiesen werden konnte, dass die basischen Aminosäuren H565 und H571 keine essenzielle Funktion in pUL89 erfüllen.

## Summary

### Summary

The human cytomegalovirus DNA packaging mechanism is characteristic for large DNA viruses like Herpes viruses and ds bacteriophages. This mechanism is based on the cleavage of concatemeric DNA by the viral heterooligomeric protein complex terminase.

This dissertation includes the identification and characterization of functional domains of the HCMV terminase subunit pUL89. PUL89 contain a nuclease activity and the ability to bind dsDNA. This protein shows the property to cut as well dsDNA as linear DNA. The amino acid D463 shows a significant role in this cleavage event. Colorimetric DNA binding experiments show the central role of R544 in DNA binding by pUL89.

Based of the *in vitro* results recombinant TB40/E viruses with mutations in the ORF *UL89* were generated. These viruses allow a characterization of the impact of virus replication. It was possible to show that the amino acids E534 and R544 have a functional role in HCMV. The mutation of one of these amino acids was enough to generate a growth deficient mutant. The stable cell lines HELF Fi301-UL89 and HELF Fi301-vProm UL89 were used for the characterization of the growth deficient mutants. The growth competent mutants H656A and H571A show no significant differences in comparison with the wild type TB40/E virus. This was verified by growth kinetics, protein expression characterizations, pulse field gel electrophoresis, DNA binding assays and electron microscopy.

### 1. Einleitung

#### 1.1 Humanes Cytomegalievirus und Herpesviren

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der *Herpesviridae* und tritt als einer von neun human-pathogenen Vertreter dieser Virusfamilie weltweit auf. Charakteristisch für eine herpesvirale Infektion ist die Ausbildung einer lebenslangen Persistenz im Wirtsorganismus. Während dieses Stadiums nimmt das virale Genom eine geschlossene, zirkuläre Form an und eine geringfügige Expression von bestimmten virustypischen Genen ist nachweisbar<sup>1</sup>.

Die Unterteilung der Herpesviren folgt den Richtlinien der Herpesvirus *Study Group* des *International Committee for the Taxonomy of Viruses* (ICTV) in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Herpesvirinae*. Charakteristische Vertreter der  $\alpha$ -*Herpesvirinae* sind die humanen Herpesviren 1 bis 3 (HHV 1-3). HHV-1 und HHV-2, welche auch als Herpes simplex Virus Typ-1 und -2 (HSV-1 und -2) bezeichnet werden, führen zu einer Herpes simplex-Infektion, in Verbindung mit der Ausbildung eines Herpes labialis (HSV-1) oder Herpes genitales (HSV-2). Das humane Herpesvirus 3 wird auch als Varizella-Zoster-Virus (VZV) bezeichnet und stellt den Erreger der hochinfektiösen Windpocken und Gürtelrose dar. HCMV, welches auch als humanes Herpesvirus 5 bezeichnet wird gehört zu der Unterfamilie der  $\beta$ -*Herpesvirinae*, ebenso wie die humanen Herpesviren 6a und 6b sowie das Roseolovirus (HHV-7). Human pathogene Vertreter der  $\gamma$ -*Herpesvirinae* sind das Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) sowie das Kaposi-Sarcoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV, HHV-8). Das Epstein-Barr-Virus ist der Erreger des Pfeifferschen Drüsenfiebers, welches auch als Mononukleose bezeichnet wird<sup>1,2</sup>

Charakteristisch für die drei Unterfamilien der *Herpesviridae* sind Unterschiede in der Wirtsspezifität, Replikationsdauer und Verhalten in der Zellkultur. Während die  $\alpha$ -*Herpesvirinae* sich durch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus (24 h), sowie eine zytolytische Zerstörung der Wirtszelle auszeichnen, besitzen  $\beta$ -*Herpesvirinae* ein eingeschränktes Wirtsspektrum, eine langsame Ausbreitung in Zellkultur und einen langen Replikationszyklus (72 h). Ein weiteres Kennzeichen dieser Subfamilie ist die Vergrößerung der infizierten Zellen, welche als Zytomegalie bezeichnet wird<sup>3</sup>.

## Einleitung

Die  $\gamma$ - *Herpesvirinae* weisen ein limitiertes Wirtsspektrum auf, welches auf die Familie oder Ordnung des natürlichen Wirtes begrenzt ist. Sie infizieren spezifisch B- oder T-Lymphozyten, in denen ein lytischer oder prälytischer Infektionszyklus auftreten kann. Eine Latenz wird im lymphatischen Gewebe des Wirtsorganismus ausgebildet. Die Kultivierung dieser Viren *in vitro* kann in lymphoblastoiden Zellen erfolgen, einige zeigen zusätzlich eine lytische Infektion in epitheloiden und fibroblastischen Zellen<sup>3</sup>.

### 1.2 Epidemiologie

HCMV tritt mit unterschiedlicher Prävalenz weltweit auf. Während in Entwicklungsländern eine Seroprävalenz von nahezu 90 % in Kindern nachweisbar ist, liegt diese Rate in Industrieländern bei Jugendlichen zwischen 20-25 %<sup>3,4</sup>. Auch im Erwachsenenalter ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Industrieländern mit 60 % und Entwicklungsländern mit einer Prävalenz von fast 100%<sup>5</sup>.

Eine Übertragung des Virus kann über Körperflüssigkeiten wie Cervixsekret und Samenflüssigkeit stattfinden. Aber auch eine Verbreitung über die Muttermilch bzw. Speichel und Urin ermöglicht eine Infektion im Säuglings- bzw. Kleinkindalter. Des Weiteren ist die Übertragung durch Bluttransfusionen und Transplantationen von klinischer Relevanz<sup>6,7</sup>.

Die Infektion mit HCMV führt bei immunkompetenten Personen in der Regel zu einer asymptomatischen Verbreitung im Körper. Diese Infektion ist mit einer Persistenz-Ausbildung verbunden und es kann gegeben falls zu einer asymptomatischen Reaktivierung des Virus kommen. Im Gegensatz dazu sind die Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind *in utero*, sowie die Infektion bzw. Reaktivierung in immunsupprimierten Patienten von klinischer Bedeutung. Eine Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft führt mit einer 32ig %-Wahrscheinlichkeit zu einer Übertragung auf das ungeborene Kind. Im Vergleich dazu liegt die Transmissionsrate bei einer Reaktivierung während der Schwangerschaft bzw. einer Superinfektion mit einem zweiten Virusstamm bei einem geringeren Prozentsatz von ca. 1,4 %<sup>8</sup>. Während bei 90 % der infizierten Neugeborenen eine asymptomatischen HCMV-Infektion auftritt, weisen ca. 10 % der Säuglinge eine angeborene CMV-Erkrankung (*symptomatic congenital CMV disease*) auf. Des Weiteren kommt es bei 10-



## Einleitung

15 % der asymptomatischen Neugeborenen zu Entwicklung von Spätschäden. Es treten mentale Beeinträchtigungen, motorische Defizite sowie Störungen bei der Entwicklung von zahlreichen Organen auf. Zu den Spätschäden einer HCMV-Infektion während der Schwangerschaft zählen Hepatomegalie, Splenomegalie, Pneumonitis, Ikterus, Mikrozephalie und Thrombozytopenie. Ebenso können Hörschäden, bis hin zu völligen Taubheit auftreten<sup>9</sup>.

Neben der Infektion von Föten und Säuglingen ist auch die Infektion bzw. Reaktivierung in immunsupprimierten Patienten von klinische Bedeutung. Zu diesen Patienten zählen neben Transplantatempfängern auch Menschen, die aufgrund einer viralen Infektion mit z.B. dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), immunsupprimiert sind. Bei diesen Patienten können aufgrund der Infektion bzw. Reaktivierung des Virus schwerwiegenden Komplikationen wie eine Retinitis, Pneumonitis, Bronchiolitis, Erhöhung der Anfälligkeit für weitere Infektionen oder sogar Transplantatabstoßungen auftreten<sup>7,10</sup>.

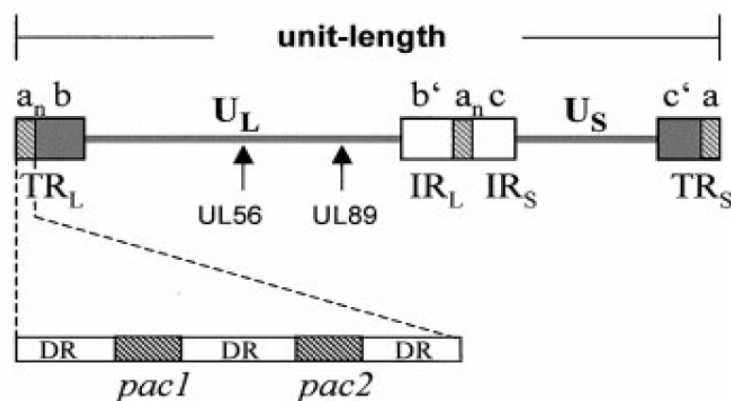
In der HCMV-Therapie werden zurzeit die Nukleosid-Analoga Ganciclovir<sup>11</sup>, Valganciclovir<sup>12</sup> und Cidofovir<sup>13</sup>, sowie das Pyrophosphat Analog Foscarnet<sup>14</sup> eingesetzt. Die eingesetzten Chemotherapeutika weisen jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Knochenmarks- und renale Toxizität auf und führen zu einer raschen Resistenzentwicklung der Viren. Darüber hinaus findet Fomiviren, eine *anti-sense* Ribonukleinsäure (RNA), welche spezifisch an die *messenger* RNA (mRNA) der MIE (*major immediate-early*) transkriptionellen Einheit von HCMV bindet, in der Praxis Anwendung. In den letzten zehn Jahren wurden die drei potenziellen Therapeutika Maribavir (MBV), Brincidofovir (BCV) und Letemovir (LMV) für die Prophylaxe einer HCMV-Infektion in adulten Empfänger einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation entwickelt. Während Brincidofovir in der dritten klinischen Phase gescheitert ist, wurde Letemovir 2018 zur prophylaktischen Behandlung in Europa zugelassen<sup>15</sup>. Diese Substanz inhibiert den Desoxyribonukleinsäure-Verpackungskomplex (DNA-Verpackungskomplex) der Viren<sup>7,16</sup>. Jedoch wurde bei dieser prophylaktischen Behandlung ebenfalls eine Resistenzausbildung durch HCMV in beteiligten Proteinen des DNA-Verpackungskomplexes festgestellt<sup>17,18</sup>. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Überwindung der Resistenzausbildung in der HCMV-Therapie durch eine Kombinationstherapie bestehend aus mindestens zwei Virostatika möglich ist. So zeigten erste *in vitro* Kombinationsversuche von Letemovir und 2-Bromo-5,6-dichloro-1-beta-Dribofuranosyl benzimidazole (BDCRB) gute Erfolge<sup>19,20</sup>.

# Einleitung

Zurzeit gibt es keine zugelassene Vakzine gegen HCMV, jedoch befinden sich mehrere Impfstrategien wie Protein-Untereinheiten-Impfstoffe, DNA-Vakzine, Vektorbasierte Impfstoffe, Peptid-Vakzine und lebend-attenuierte Impfstoffe in präklinischer und klinischer Testung<sup>21,22</sup>.

### 1.3 Aufbau von HCMV

Die Morphologie von HCMV ist charakteristisch für Herpesviren. Es gehört zu den doppelsträngigen DNA-Viren (dsDNA) und besitzt ein Genom mit einer Größe von ca. 230 Kilobasenpaaren (kbp). Dieses Genom verfügt über 208 offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) und weist damit die größte Kodierungskapazität unter den Herpesviren auf<sup>23,24</sup>. Es setzt sich aus zwei nicht repetitiven Bereichen, die als *unique-long-* (UL) und *unique-short-* (US) Segmente bezeichnet werden, sowie terminalen und nicht-terminalen repetitiven Bereichen zusammen (*terminal* und *internal repeats*) (s. Abb. 1).

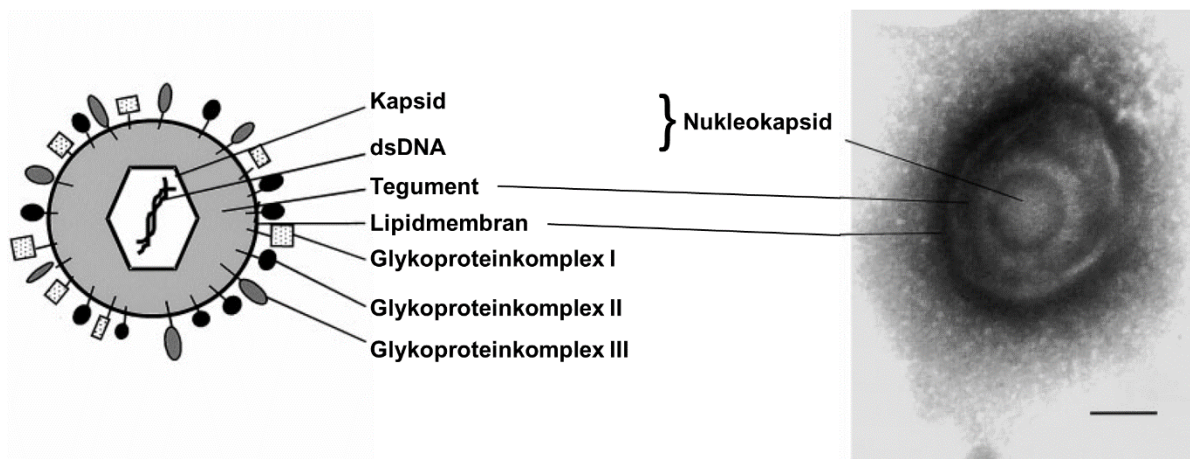


**Abbildung 1: Genomorganisation von HCMV.** Das Genom ist in zwei nicht-repetitive Segmente unterteilt, die als *unique-long* (UL) und *unique-short* (US) bezeichnet werden. Diese Segmente werden von terminalen und nicht-terminalen repetitiven Sequenzen flankiert und separiert. Die repetitiven Sequenzen beinhalten die a-Sequenz mit den Verpackungsmotiven *pac1* und *pac2* (entnommen aus: Bogner, 2002<sup>24</sup>).

Aufgrund dieser Unterteilung der einzelnen Genomabschnitte werden die entsprechenden Genprodukte mit den Präfixen TR, IR, UL oder US klassifiziert<sup>25,26</sup>. Das lineare dsDNA-Genom des humanen Cytomegalievirus ist in einem ikosaedrischen Kapsid lokalisiert, welches eine Größe von ca. 100 nm aufweist. Eine schematische Darstellung, sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme sind in Abbildung 2 dargestellt. Das Kapsid besteht aus vier abundanten Proteinspezies, welche in 162

## Einleitung

Kapsomeren und 320 Triplexen angeordnet sind. Die Kapsomere bestehen aus Hexamere oder Pentamere des MC-Proteins (*major capsid protein*, pUL86, 154 kDa). Zwischen den Kapsomeren sind die Triplexe, welche aus zwei Kopien des mC-Proteins (*minor capsid protein*, pUL85, 35 kDa) und einer Kopie des mCP-BP (*minor capsid binding protein*, pUL46, 33 kDa) bestehen, lokalisiert. Als vierte Proteinspezies befinden sich an jedem Hexon sechs Kopien des SC-Proteins (*smallest capsid protein*, pUL48/ 49, 8,5 kDa). Des Weiteren liegen die Proteine pUL77 und pUL93 assoziiert am ikosaedrischen Kapsid vor, beide Proteine sind an der DNA-Verpackung beteiligt<sup>27,28</sup>. An einer Ecke des Kapsid ist der Portal-Komplex, bestehend aus 12 Kopien des Portalproteins pUL104 (79 kDa), lokalisiert. Dieser Komplex, welcher Teil des viralen Nanomotors ist, ermöglicht die Freisetzung bzw. Aufnahme der viralen dsDNA in das Kapsid.<sup>29,30</sup>



**Abbildung 2: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung des humanen Cytomegalievirus.** Die virale DNA ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, zusammen bilden sie das Nukleokapsid. Umhüllt ist das Nukleokapsid von der Tegumentschicht, einer amorphen und asymmetrischen Substanz mit enzymatischen Aktivitäten. Umschlossen wird die Tegumentschicht von der Lipidmembran, welche auch *Envelope* genannt wird. In dieser Lipidschicht sind verschiedene Glykoproteine verankert, welche in drei verschiedenen Komplexen (Glykoproteinkomplex I-III) angeordnet sind (entnommen aus: Bogner, 2002<sup>24</sup>).

Das Kapsid wird von einer sogenannten Tegument-Schicht umschlossen, bei der es sich um eine amorphe und asymmetrische Substanz handelt, welche verschiedene enzymatischen Aktivitäten aufweist. Ebenfalls beinhaltet das Tegument die Mehrzahl der Phosphoproteine und modulatorische Komponenten, welche sowohl die virale als auch die zelluläre Genexpression beeinflussen. So konnten bereits verschiedene 22-Nukleotide lange miRNAs (microRNAs) identifiziert werden, welche nur in infizierten Zellen gebildet werden und vermutlich an der Genregulation beteiligt sind<sup>31,32</sup>. Die Tegument-Schicht weist eine Dicke von ca. 50 nm auf und wird hauptsächlich durch das

## Einleitung

Phosphoprotein pUL32 (*basic phosphoprotein*, 149 kDa), sowie die beiden Matrixproteine pUL82 (*upper matrix protein*, 74 kDa) und pUL83 (*lower matrix protein*, 69 kDa) gebildet<sup>29</sup>. Ebenfalls vermitteln die Phospho- und Matrixproteine eine Verbindung des Teguments mit dem Kapsid. Umgeben werden sie von einer Hüllmembran, der sogenannten *Envelope*. Diese ca. 10 nm dicke Hülle beinhaltet die abundantesten Proteine von HCMV. Neben viralen Glykoproteinen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zählen auch zelluläre Proteine zu den Bestandteilen des *Envelope*<sup>2,29,33</sup>. Die Glykoproteine sind in verschiedenen Komplexen angeordnet. So besteht der Glykoproteinkomplex-I (gCI) aus dem abundanten Glykoproteine B (gB), während der Glykoproteinkomplex-II (gCII) aus den viralen Glykoproteinen M und N (gM und gN) besteht. Die Glykoproteine H, L und O (gH, gL und gO) bilden zusammen den Glykoproteinkomplex III (gCIII). Die verschiedenen Glykoproteinkomplexe sind unter anderem essenziell für die Bindung an zelluläre Rezeptoren und der Adsorption an die Wirtszelle, sowie der Bildung von neuen infektiösen Virionen und der Verhinderung der Virusneutralisierung durch die Wirtszelle<sup>30,34</sup>.

### 1.4 Viraler Replikationszyklus

Der virale Replikationszyklus von HCMV beginnt mit der Bindung des Virus an die Oberflächenrezeptoren der Zielzelle und der sich anschließende Infektion der Zelle durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Diese Bindung an die Zielzelle wird ähnlich wie bei HSV über das Glykoprotein B (gCI) vermittelt<sup>35</sup>. Die Vielzahl der Zellen, welche von HCMV infiziert werden können, deutet dabei auf verschiedene Bindungspartner hin. Dazu gehören der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der *platelet-derived growth factor receptors* (PDGF-R) und das Integrin<sup>36–38</sup>.

Durch die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, kommt es zur Freisetzung von Nukleokapsid und Tegument in das Cytoplasma der Zielzelle, wo mittels des Mikrotubuli-Netzwerkes ein Transport des Nukleokapsids zum Nukleus der Zielzelle stattfindet<sup>23</sup>. Es folgt die Freisetzung des viralen Genoms durch die Kernporen in das Nukleoplasma, wo es zirkularisiert<sup>39,40</sup>. Anschließend an die Zirkularisierung des viralen Genoms findet die virale Genexpression statt. Die Genexpression in Herpesviren ist kaskadenartig gestaltet, beginnend mit den sogenannten *immediate early*-Genen (IE-Genen), welche einen G1/ Zellzyklusarrest vermitteln und dadurch die Replikation der zelleigenen Gene herunterregulieren<sup>41</sup>. Des Weiteren sind die IE-Gene essenziell

## Einleitung

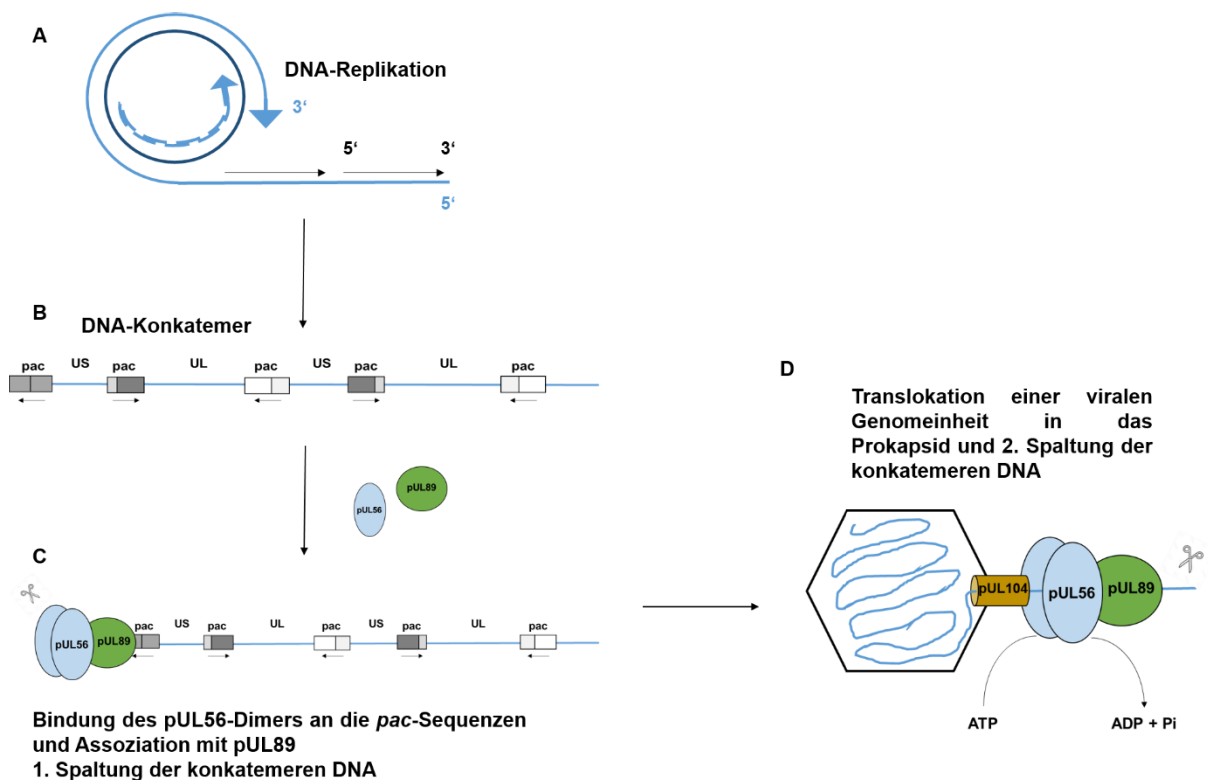
für die Regulation der *early*-Gene (E-Gene). Die E-Gene kodieren für virale Enzyme und regulieren die Expression der *late*-Gene (L-Gene), welche für strukturelle Komponenten, wie Tegument- und *Envelope*-Proteine kodieren. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt über einen sogenannten *rolling-circle*-Mechanismus<sup>39</sup>. Dieser Replikationsmechanismus führt zur Bildung sogenannter Konkatemeren, vielfach, aneinandergereihte, gleichlange und zueinander invertierte, virale Genomeinheiten. Anschließend wird die konkatemere, virale DNA von dem hetero-oligomeren Proteinkomplex Terminase, bestehend aus den Proteinen pUL56, pUL89 und pUL51, über einen *unit-length*-Mechanismus in vorgeformte Prokapside (B-Kapside) verpackt. Im Gegensatz zum *head-full*-Mechanismus, kommt es dabei zur Verpackung genau einer Genomeinheit<sup>29</sup>.

Prokapside bestehen aus den komplexierten Strukturkomponenten *assembly protein precursor* (pAP) und *proteinase precursor* (pPR), sowie Kapsomeren und den dazwischenliegenden Triplexen, welche durch das *major capsid protein* (MCP, Kapsomeren), *minor capsid protein* (mCP) und dem mCP-Bindeprotein (Triplexen) gebildet werden. Die Verpackung der viralen DNA führt zu einer Umstrukturierung, sowie proteolytischen Spaltung des pAP-pPR-Komplexes, wodurch reife, DNA-enhaltende C-Kapside entstehen. Eine fehlerhafte DNA-Verpackung führt hingegen zu einer Entstehung von sogenannten A-Kapsiden, welche keine virale DNA enthalten<sup>29</sup>. Anschließend erfolgt die Knospung der Nukleokapside in das Cytoplasma der Wirtszelle. Die Nukleokapside werden in den perinukleären Zisternen mit einer temporären Membranhülle umschlossen, welche bei der Knospung der Kapside über die äußere Kernmembran verloren geht. Nach erfolgter Translokation in das Cytoplasma der infizierten Zelle werden sie zu dem viralen *Assembly*-Komplex<sup>42</sup> transportiert. Im viralen *Assembly*-Komplex werden die Nukleokapside mit Tegumentproteinen und der finalen Hüllmembran, welche mit viralen Glykoproteinen modifiziert ist, versehen<sup>43</sup>. Die entstandenen infektiösen Virionen werden an der Zellmembran über Exozytose aus der Wirtszelle entlassen<sup>44,45</sup>. Neben den infektiösen Virionen werden auch nicht-infektiöse Viruspartikel gebildet. Zu diesen zählen neben den sogenannten *dense bodies*, welche Komplexe aus Tegument und Hüllproteine darstellen, auch leere, umhüllte Kapside, welche keine virale DNA enthalten und als *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) bezeichnet werden<sup>29</sup>.

## Einleitung

### 1.5 DNA-Verpackungsmechanismus von HCMV

Essenziell für die Replikation von dsDNA-Viren ist die Verpackung der neu-gebildeten Genome in vorgeformte Prokapside. Dieser Prozess, welcher im Nukleus der infizierten Zellen stattfindet, ist innerhalb der Familie der *Herpesviridae* konserviert und konnte erstmals bei dsDNA-Bakteriophagen beschrieben werden<sup>46</sup>. Die Replikation des viralen Genoms führt zur Ausbildung von Konkatemeren, welche durch einen hetero-oligomeren Proteinkomplex, der Terminase, in einzelne Genome geschnitten und mittels des Portalproteins pUL104 sowie unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) in die vorgeformten Prokapside transloziert werden<sup>47</sup>. In Abbildung 3 ist die DNA-Verpackung von HCMV schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des DNA-Verpackungsmechanismus von HCMV.** (A) Die DNA-Replikation von HCMV erfolgt durch einen *rolling circle*-Mechanismus, was zur Ausbildung von (B) DNA-Konkatermen führt, welche aneinandergereihte Genomeinheiten darstellen. (C) Es schließt sich die Bindung des Terminase-Komplexes bestehend aus dimerisierten pUL56 und assoziiertem pUL89 an. Die erste Spaltung der konkatemeren DNA findet statt. (D) Assoziation des Terminase-Komplexes mit dem Portalprotein pUL104 und Translokation der viralen Genomeinheit in das vorgeformte Prokapsid. Die zweite Spaltung der konkatemeren DNA findet statt (modifiziert nach Bogner, 2002<sup>24</sup>).

Durch die Analyse von Genomsequenzen von dsDNA-Bakteriophagen und HSV konnten sieben virale Genprodukte (UL104, UL93, UL89, UL77, UL56, UL52 und UL51) in HCMV als essenziell für die DNA-Spaltung und –Verpackung identifiziert werden<sup>48</sup>. Die

## Einleitung

viralen Proteine pUL89, pUL56 und pUL51 bilden den Terminase-Komplex, welcher für die sequenzspezifische Spaltung des viralen Genoms und der ATP-Hydrolyse für die Translokation essenziell ist. Die ATPase pUL56 bindet spezifisch an die Verpackungssequenzen *pac1* und *pac2* (*packaging motif* 1 und 2), welche innerhalb der *a*-Sequenzen im viralen Genom lokalisiert sind<sup>49</sup>. Die *a*-Sequenzen befinden sich an beiden Genomenden und invertiert an der L-S-Verknüpfung<sup>50,51</sup> (s. Abb. 1). Ergänzend zu dieser Funktion besitzt pUL56 eine ATPase-Aktivität, die die benötigte Energie für die Translokation der geschnittenen Genome in die Prokapside, bereitstellt<sup>52–54</sup>.

Die Nuklease pUL89 besitzt eine sequenz-unspezifische DNA-Bindungsaktivität und eine Nuklease-Aktivität, durch welche die konkatemere DNA in einzelne Genome geschnitten wird<sup>55</sup>. Das Genprodukt *UL51* ist ebenfalls in der Spaltung der viralen DNA involviert und liegt assoziiert mit den Terminase-Proteinen pUL56 und pUL89 vor<sup>56</sup>.

Die Translokation der viralen DNA erfolgt über einen Portalkomplex, welcher aus Kopien des Portalproteins besteht. Dieser Komplex ist an einem Kapsidvertex lokalisiert und wird bei HCMV von dem Genprodukt des *open reading frames* (ORF) *UL104* gebildet<sup>57</sup>. Dieses aus zwölf Untereinheiten bestehende Dodekamer aggregiert und formt einen, für Portalproteine typischen, tunnelartigen Kanal an einem Vertex<sup>57–59</sup>.

Zusammen mit dem Portalprotein pUL104 bilden die Terminase-Proteine pUL51, pUL56 und pUL89 den Nanomotor von HCMV. Aufgrund der Kondensation der dsDNA erfolgt die Verpackung der Genomeinheiten gegen einen sehr großen inneren Widerstand, welcher mit Hilfe einer ATP-Hydrolyse überwunden wird<sup>54</sup>. Für die Verpackung von 2 bp wird ein ATP-Molekül benötigt, sodass der HCMV-Nanomotor einen der effektivsten molekularbiologischen Motoren darstellt<sup>60</sup>.

### 1.5.1 Portalprotein pUL104

Die Translokation der neusynthetisierten viralen dsDNA in die Prokapside benötigt ein Portalprotein, welches an einem Kapsidvertex lokalisiert ist. Bei HCMV handelt es sich um das Genprodukt des ORF *UL104*, welches oligomerisiert und ein Dodekamer ausbildet. In seiner oligomerisierten Form bildet es einen Kanal, durch den die virale dsDNA in das ikosaedrische Prokapsid geschleust wird<sup>57</sup>. Der ORF *UL104* kodiert für ein 698 Aminosäuren- (AA, *amino acids*) langes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 73 kDa. Dieses Protein besitzt die Eigenschaft ein Multimer aus zwölf bis 13 Monomeren zu bilden<sup>59</sup>. Portalproteine konnten auch in anderen dsDNA-Viren wie

## Einleitung

dsDNA-Bakteriophagen und HSV-1 (pUL6) identifiziert werden. Ebenfalls konnte eine Interaktion mit der ATPase pUL56 nachgewiesen werden. Des Weiteren besitzt pUL104 die Fähigkeit dsDNA kurzzeitig während der Translokation sequenz-unspezifisch zu binden<sup>52,58</sup>.

### 1.5.2 Nuklease pUL89

Der ORF der Nuklease pUL89 umfasst 2.025 bp und kodiert für ein ca. 75 kDa großes Protein mit 674 Aminosäuren. Das Protein weist eine geringe Sequenzhomologie innerhalb der *Herpesviridae* auf, jedoch konnten analoge Proteine innerhalb der Familie identifiziert werden. In einer 2006 veröffentlichte Studie konnte gezeigt werden, dass die carboxyterminale Sequenz GRDKALAVEQFISRFNSGYIK (AA 580-600) eine Interaktion von pUL89 mit der ATPase pUL56 ermöglicht<sup>61</sup>. PUL89 neigt zur Dimerisierung. Des Weiteren konnte nachgewiesen, dass pUL89 essenziell für die Spaltung der konkatemeren dsDNA ist<sup>55</sup>. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass pUL89 die Fähigkeit besitzt an dsDNA zu binden<sup>62</sup>.

### 1.5.3 ATPase pUL56

Der ORF *UL56*, welcher 2.552 bp umfasst, kodiert für ein 100 kDa großes Protein mit einer Länge von 850 Aminosäuren. Diese Terminase-Untereinheit ist hochkonserviert innerhalb der *Herpesviridae* und weist zahlreiche Homologe wie pUL28<sup>63</sup> in HSV-1 und ORF30<sup>64</sup> in VZV auf. PUL56 besitzt im Carboxy-Terminus eine ATP-Bindestelle im Bereich der Aminosäuren 709-716 (YNETFGKQ)<sup>54</sup>, eine DNA-Bindungsstelle, welche eine spezifische Bindung der konservierten Sequenzmotive *pac1* und *pac2* ermöglicht<sup>50</sup> und ein NLS (*nuclear localization signal*, AA 816-827). Dieses NLS ermöglicht einen Import des Proteins in den Nukleus von infizierten Zellen<sup>65</sup>. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Sequenz WMVVKYMGGFF (AA 671-680) eine Bindung mit der Nuklease pUL89 ermöglicht<sup>66</sup>. Dieses Protein liegt aktiv als Dimer vor und bildet eine ringförmige Struktur aus, welche typisch für DNA-Bindeproteine ist. Das Dimer weist einen äußeren Durchmesser von ca. 9 nm und eine zentrale Furche mit einer Größe von ca. 3,5 – 2,5 nm auf<sup>67</sup>. Diese Furche ist ausreichend um eine sequenzspezifische DNA-Bindung zu ermöglichen<sup>29,49,52</sup>.



### 2. Problemstellung

Eine Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus bzw. die Reaktivierung einer bestehenden Infektion in bestimmten Patientengruppen, sowie die geringe Bioverfügbarkeit und Toxizität der aktuellen Therapeutika zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung von neuen und innovativen Behandlungsmöglichkeiten. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die virale Resistenzausbildung gegen bestehende Virostatika, welche neue wirksame antivirale Substanzen unabdingbar machen.

Entscheidend für die Entwicklung neuer Virostatika ist die Charakterisierung des viralen Replikationsmechanismus und damit in Verbindung stehend die Identifizierung der an diesem Prozess beteiligten viralen Proteine, welche mögliche Angriffspunkte darstellen. Der Terminase-Komplex mit seinen funktionellen Untereinheiten bildet in dieser Hinsicht einen aktuellen Forschungsschwerpunkt. 2018 wurde Letemovir ausschließlich zur prophylaktischen Behandlung von adulten hämatopoetischen Stammzelltransplantat-Empfängern zugelassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung der funktionellen Domänen der Nuklease pUL89. Basierend auf *in silico* und strukturellen Untersuchungen soll die DNA-Bindungsdomäne identifiziert und anschließend biochemisch durch Mutationsanalysen und *in vitro* DNA-Bindungsuntersuchungen charakterisiert werden. Anschließend sollen auf Basis dieser Erkenntnis rekombinante Viren mit Hilfe der *En Passant* Mutagenese hergestellt sowie zell- und immunbiologisch analysiert werden. Ergänzend sollen die rekombinanten Viren mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen strukturell untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung und Charakterisierung der Nuklease-Domäne von pUL89. Basierend auf Publikationen von Marta Nadal<sup>68</sup> und Sundaresan Selvarajan Sigamani<sup>69</sup> sollen Mutationsanalysen der potenziell funktionellen Aminosäuren durchgeführt und anschließend durch *in vitro* Nuklease-Untersuchungen charakterisiert werden. Die Untersuchungen beinhalten eine Konzentrationsbestimmung von pUL89, sowie die Testung der Alanin-Austauschmutanten, als auch die Spaltung von einzelsträngiger DNA.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Zelllinien

###### 3.1.1.1 Humane embryonale Nierenzellen 293T (HEK-293T, *human embryonic kidney cells 293T*)

Zur Analyse der rekombinanten Proteine wurde die Zelllinie HEK-293T als Expressionssystem gewählt. Diese Zelllinie ist ein Derivat der HEK-293-Zellen, welche 1973 im Labor von Alex J. van der Eb (Universität Leiden, Niederlande) durch eine Transformation einer humanen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Fragmenten des menschlichen Adenovirus Typ 5 entstanden ist<sup>70</sup>. Das Derivat HEK-293T bildet bei einer Kultivierung von 37°C einen adhärennten Monolayer aus und exprimiert das T-Antigen des Simian-Virus 40<sup>71</sup>.

###### 3.1.1.2 Humane embryonale Lungenfibroblasten (HELFI Fi301, *human embryonic lung fibroblast*)

Die Zelllinie HELFI Fi301 stammt von einem Abort aus den DRK Kliniken Berlin Köpenick (Berlin, Deutschland) und wurde vom ehemaligen Institut für angewandte Virologie (Niederschöneweide, Berlin) zur Verfügung gestellt. Eine Identifizierung der Zelllinie wurde durch das Leibniz Institut- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) durchgeführt. Diese Zelllinie wurde für die Infektionsuntersuchungen mit HCMV eingesetzt. Es wurden Zellen mit einer Passagenzahl zwischen acht und 16 verwendet.

##### 3.1.2 Virusstamm HCMV TB40/E

Für die *En Passant* Mutagenese wurde das bakteriell-artifizielle Chromosom 4 (BAC 4) des HCMV TB40/E-Virusstamm<sup>72</sup> verwendet. Für Virusinfektionen wurden rekonstituierte Viren aus dem TB40/E-BAC4 Wildtyp bzw. rekombinanten Mutanten verwendet.

### 3.1.3 Bakterienstämme

#### 3.1.3.1 Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$

CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms DH5 $\alpha$ <sup>73</sup> wurden zur Klonierung des Vektors pcDNA-UL89, sowie den erstellten Plasmidkonstrukten verwendet. Der Bakterienstamm basiert auf den Stamm *E. coli* K-12<sup>74</sup> und enthält Mutationen in *recA1* und *endA1*, welche eine erleichterte Transformation ermöglichen. Des Weiteren kann mit diesem Stamm eine Blau/ Weiß- Selektion durchgeführt, da er das *lacZM15*-Gen enthält.

#### 3.1.3.2 Bakterienstamm *E. coli* GS1783

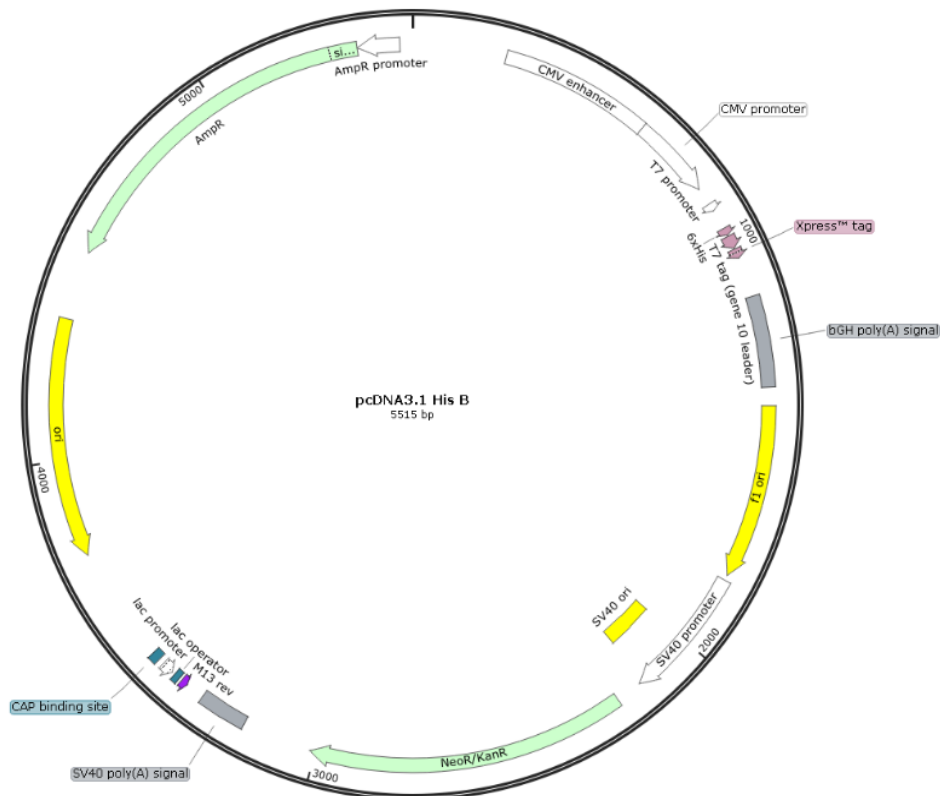
Der *E. coli*-Stamm GS1783<sup>75</sup> ist ein Derivat des Stammes EL250 und besitzt eine *I-sceI* Expressionskassette anstatt von *flpe*, welche durch L-Arabinose induzierbar ist. Das *Red Recombination*-System (*Exo*, *Beta*, *Gam*) wird durch eine Temperatur von 42°C induziert und ermöglicht die Insertion von linearer dsDNA durch homologie Rekombination. Elektro-kompetente Zellen von *E. coli* GS1783 wurden für die *En Passant* Mutagenese von TB40/E-BAC 4 verwendet.

### 3.1.4 Plasmidkonstrukte

#### 3.1.4.1 Klonierungsvektor pcDNA3.1/ His<sup>®</sup> B

Der eukaryotische Klonierungsvektor pcDNA3.1/ His<sup>®</sup>B, welcher kommerziell bei der Firma Invitrogen AG (Karlsruhe) erwerblich ist, weist eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) und eine stromaufwärts lokalisierten Typ 7-(T7) -Promotor auf. Synthetisierte Proteine weisen an ihrem aminoterminalen Ende (N-Terminus) das Xpress<sup>™</sup>-Epitop (DLYDDDDK) und eine Abfolge von sechs hintereinanderliegenden Histidinen (6x-His-Tag) auf. Als Selektionsmarker dient ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin (Amp). Die Genkarte von pcDNA3.1/ His<sup>®</sup> B ist in Abbildung 4 dargestellt.

## Materialien

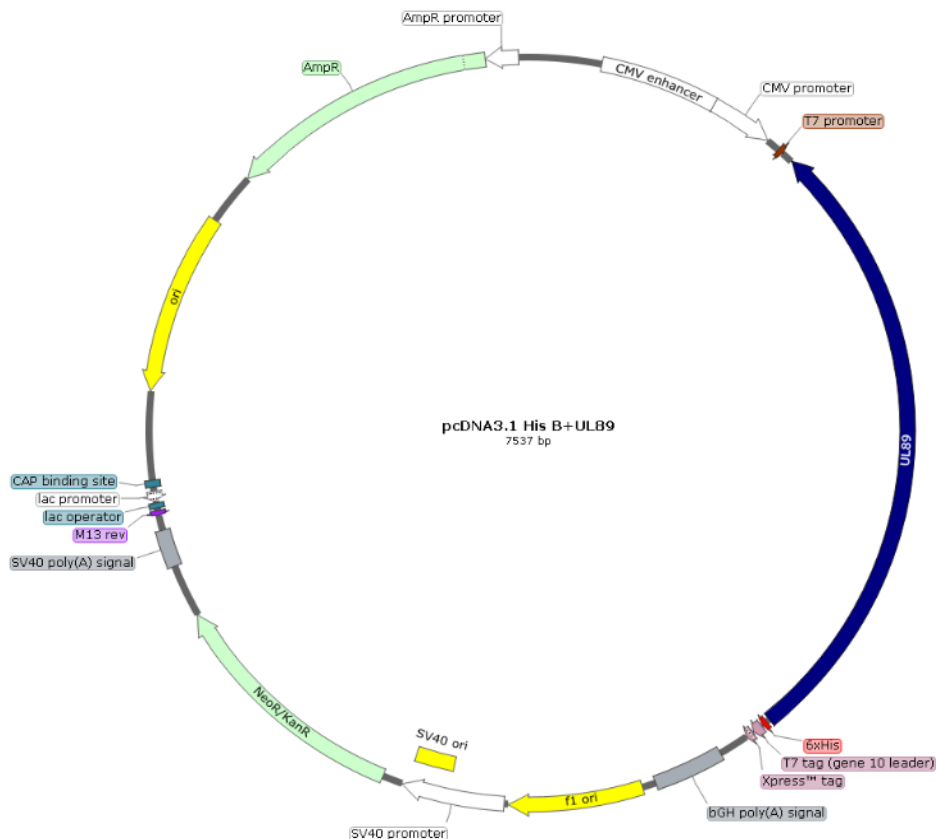


**Abbildung 4: Genkarte des eukaryotischen Klonierungsvektor pcDNA3.1/His® B (Invitrogen, Karlsruhe).** Der Vektor verfügt über eine MCS mit stromaufwärts gelegenen T7-Promotor. Exprimierte Proteine weisen ein Xpress™-Epitop, sowie eine 6x-His-Sequenz am N-Terminus auf. Als Selektionsmarker enthält der Vektor ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.2 pcDNA-UL89

Das Plasmid pcDNA-UL89 basiert auf dem Klonierungsvektor pcDNA3.1/ His®B (Invitrogen AG, Karlsruhe) und kodiert für das Wildtyp-Terminaseprotein pUL89 von HCMV<sup>55</sup>. Das Konstrukt (s. Abb. 5) wurde freundlicherweise von Frau Professor Dr. Elke Bogner zur Verfügung gestellt.

## Materialien



**Abbildung 5: Genkarte des Plasmids pcDNA-89.** In der MCS wurde das HCMV-Gen *UL89*, bestehend aus zwei Exons als kodierende DNA (cDNA) eingefügt. Es befindet sich unter der Regulation eines stromaufwärts gelegen T7 Promotors. Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine His<sub>6</sub>-Sequenz. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.3 pUC-aseq

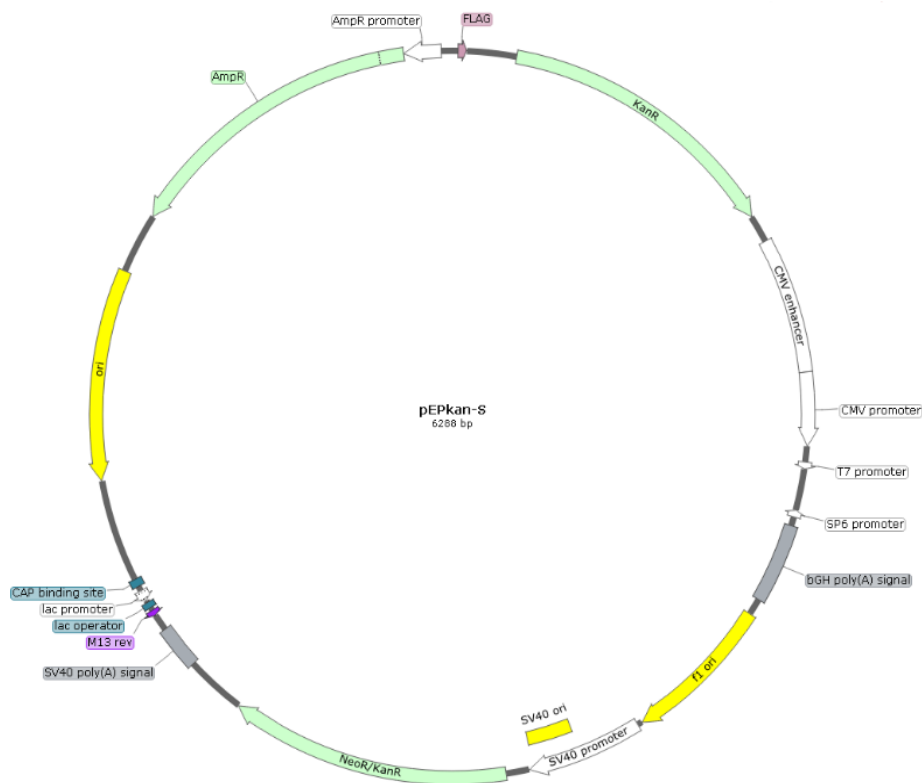
pUC-aseq wurde in den Nuklease-Untersuchungen der rekombinanten Proteine als Substrat verwendet und basiert auf dem pUC19-Vektor. Das Plasmid kodiert für die  $\alpha$  Sequenz<sup>51</sup>, welche die HCMV-Verpackungssequenzen *pac1* und *pac2* beinhaltet. Zusätzlich enthält pUC-aseq eine einzelne Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease *HindIII*. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Professor Dr. Elke Bogner zur Verfügung gestellt.

### 3.1.4.4 pEPkan-S

Das Plasmid pEPkan-S basiert auf dem Klonierungsvektor pcDNA3 (Invitrogen AG, Karlsruhe)<sup>76</sup>.

## Materialien

Es besitzt sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen und eine *Sce*-I/- Erkennungssequenz. Dieses Plasmid diente als Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-*Template* für die *En Passant* Mutagenese von TB40/E-BAC4 und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lüder Wiebusch zur Verfügung gestellt. Die Genkarte von pEPkan-S ist in Abbildung 6 abgebildet.

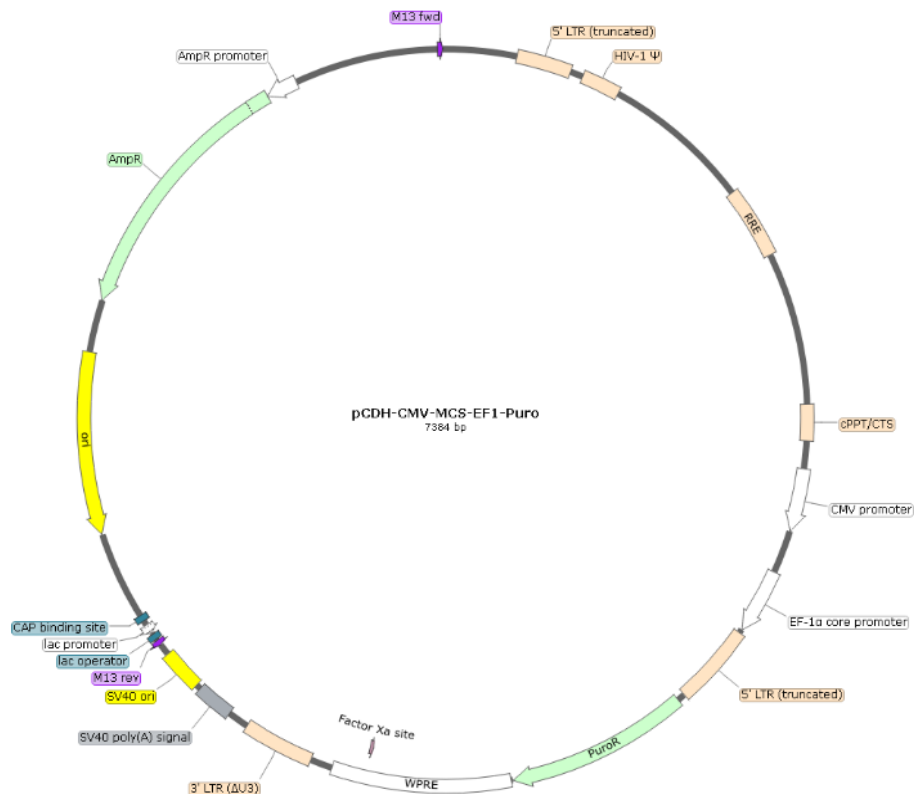


**Abbildung 6: Genkarte des Plasmids pEPkan-S<sup>76</sup>.** Das Plasmid weist ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen auf und diente als PCR-*Template* für die *En Passant* Mutagenese. . Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.5 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro

Das Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-puro besitzt zwei Resistenzgene gegen Ampicillin und Puromycin. Es handelt sich um ein Lentivirus-Plasmid der dritten Generation mit Expression in Säugerzellen und wurde für die Herstellung der komplementierenden Zelllinie verwendet. Die MCS wird durch den CMV-Promotor reguliert, während der Promotor EF1 das Puromycin-Resistenzgen reguliert. Das Plasmid (s. Abb. 7) wurde käuflich erworben bei der Firma System Biosciences (Mountain View, Kalifornien, USA).

## Materialien

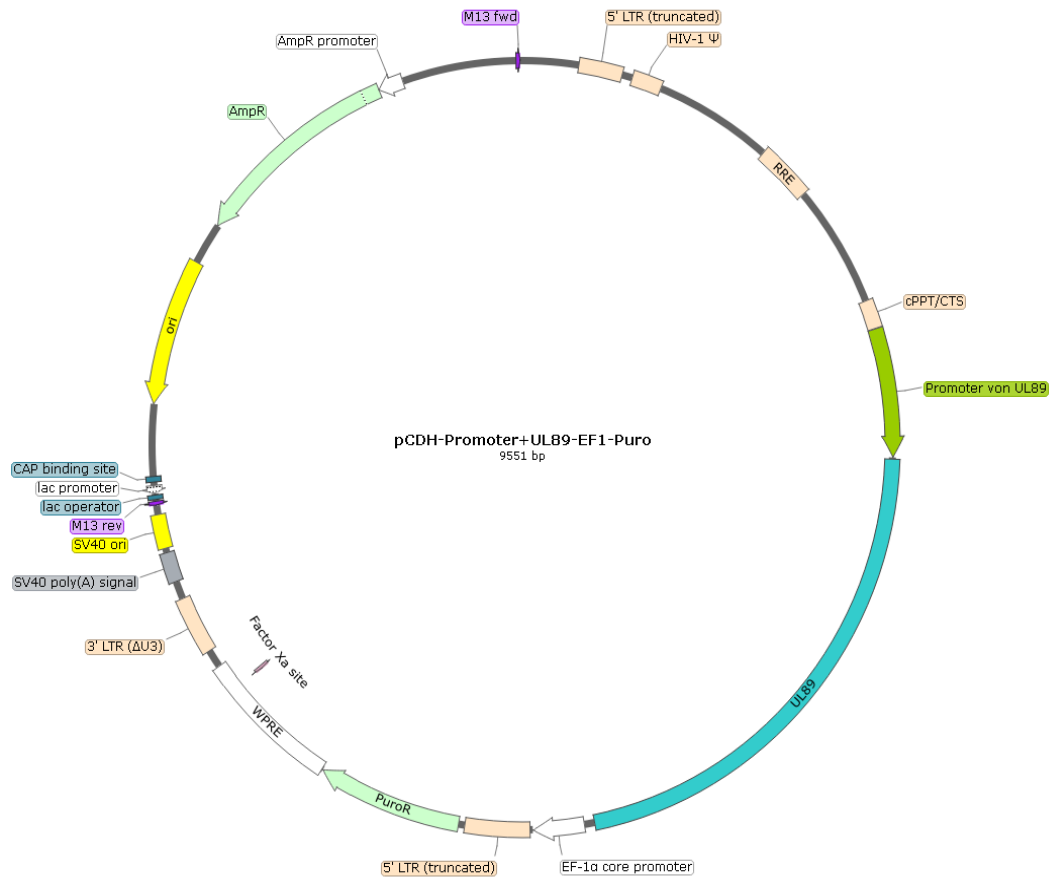


**Abbildung 7: Genkarte des Lentivirus-Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-puro.** Das Plasmid besitzt ein Ampicillin- und ein Puromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Die multiple Klonierungsstelle wird durch den CMV-Promotor reguliert. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.6 pCDH-vProm-UL89-EF1-puro

Das Plasmid pCDH-vProm-UL89-EF1-puro basiert auf dem Lentivirus-Plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-puro und wurde für die Herstellung der komplementierenden Zelllinie kloniert. Die kodierende DNA (cDNA) des ORF *UL89* wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRI* und *BamHI* in die MCS des Plasmids eingebracht. Des Weiteren wurde der CMV-Promotor durch den viralen Promotor, welcher die Expression von pUL89 im Virus reguliert, ausgetauscht. Für diesen Austausch wurden die Restriktionsendonuklease *ClaI* und *XbaI* verwendet. Die Klonierung wurde durch eine Sequenzierung der Firma LGC Genomics (Berlin) überprüft. Eine Genkarte des Plasmids ist in Abbildung 8 dargestellt.

## Materialien



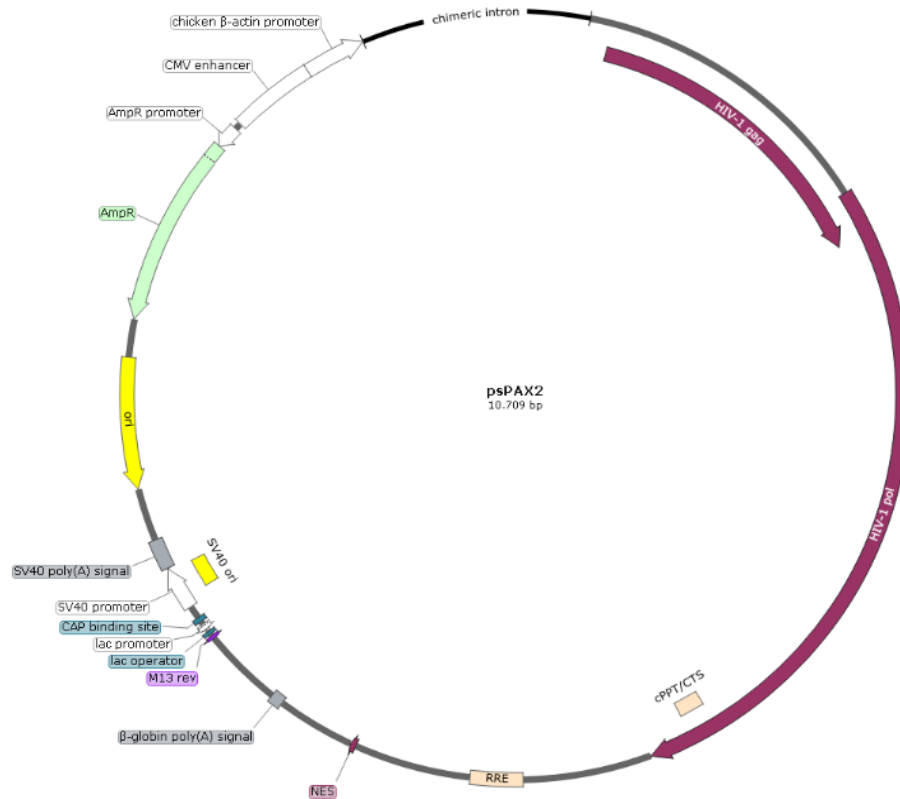
**Abbildung 8: Genkarte des Lentivektors mit inserierter UL89-Sequenz in der MCS und viralem Promotor anstatt des CMV-Promotors.** Der Vektor weist zur Selektion ein Ampicillin- und Puromycin-Resistenzgen auf. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.7 psPAX2

Das Plasmid psPAX2 stellt ein Lentivirus-Verpackungsplasmid der 2. Generation dar, welches bei der Herstellung der komplementierenden Zelllinie verwendet wurde. Es besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen, kodiert für die retrovirale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase (*pol*), sowie für die Matrix- und Kapsidproteine (*gag*) als auch den akzessorischen Genen *rev* und *tat*. PsPAX2 war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene plasmid # 12260; <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID: Addgene\_12260) und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lüder Wiebusch zur Verfügung gestellt. Abbildung 9 zeigt die Genkarte des Plasmids.



## Materialien

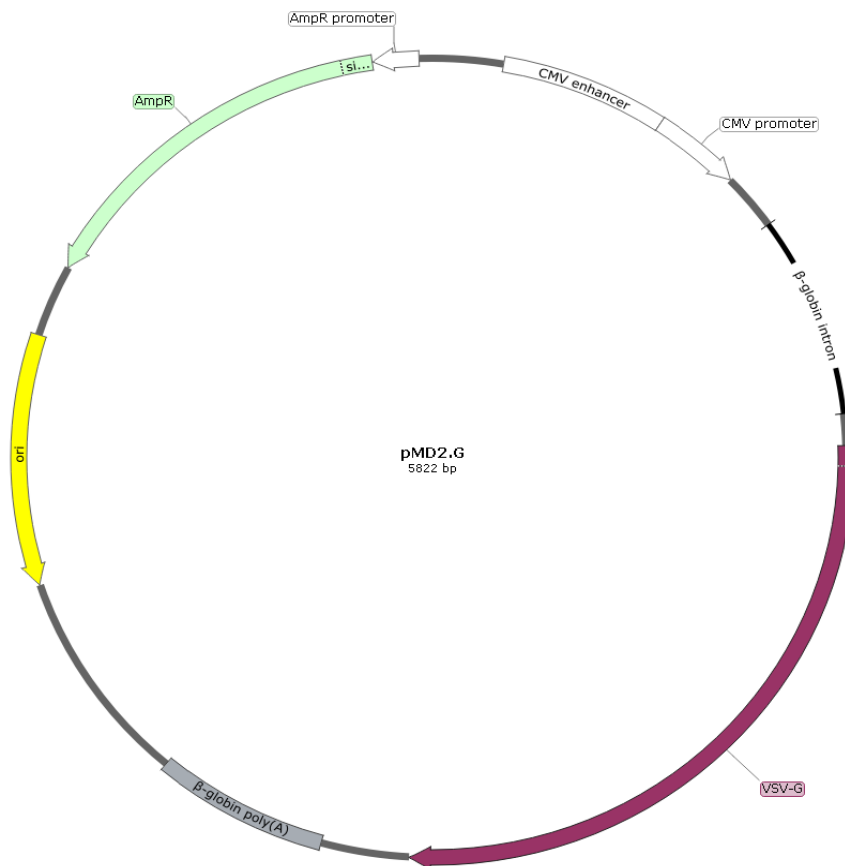


**Abbildung 9: Genkarte des Verpackungsplasmids psPAX2.** Das Lentivirus-Plasmid enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und kodiert für die viralen Gene *pol*, *gag*, *tat* und *rev*. Das Verpackungsplasmid der zweiten Generation wurde für die Herstellung der komplementierenden Zelllinie verwendet. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.8 pMD2.G

Das Lentivirus-Hüllplasmid pMD2.G enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und kodiert für das VSV-G, ein Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV). Das Plasmid wurde bei der Klonierung der komplementierenden Zelllinie als Hüllplasmid verwendet. PMD2.G war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene plasmid # 12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID: Addgene\_12259) und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lüder Wiebusch zur Verfügung gestellt. In Abbildung 10 ist die Genkarte des Plasmids dargestellt.

## Materialien



**Abbildung 10: Genkarte des Hüllplasmids pMD2.G.** Das Plasmid wurde bei der Herstellung der komplementierenden Zelllinie verwendet und kodiert für das VSV-G-Protein des Vesicular stomatitis virus (VSV). Des Weiteren besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC, San Diego, USA) erstellt.

### 3.1.4.9 pcDNA-71tag

Das Plasmid pcDNA-71tag wurde für die Rekonstitution der rekombinanten TB40/E BACs verwendet. Es kodiert für das HCMV Tegument-Protein pp71 und verstärkt die Infektionseffizienz während der Rekonstitution<sup>77</sup>.

### 3.1.5 Sequenzierung-Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

## Materialien

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide.

Plasmid	Primer [5' → 3']
<b>pcDNA3.1</b>	T7prom: TAATACGACTCACTATAGG
	pcDNA3.1-R: TAGAAGGCACAGTCGAGGCT
<b>pEPkan-S</b>	UL89Ex2-Seq-fw: GTCACGCGGCGCCGGTGTC
	UL89Ex2-Seq-rev: CCCGGGCTTTGTTAGCCGACTACG
<b>pCDH-CMV-</b>	CMV-F: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
<b>MCS-EF1-</b>	pUL89_fw-Seq-933: CACTTCATCAAGAAAGAGGCC
<b>puro</b>	Seq_pCDH_puro_CTS_fw: GACAGATCCATTCGATTAGTGAAC
	UL89_215_Seq_rev: TTTCCTCGGGCGAGTTGTAG

### 3.1.6 Antikörper

Die verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz-Analysen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Der Primärantikörper für die Western Blot-Analysen wurde in 10 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)/ 0,1 % Tween 20/ 0,02 % Natriumazid (s. Seite 28) verdünnt, bei 4°C gelagert und mehrmals verwendet. Der dazugehörige Sekundärantikörper wurde in 10 ml PBS/ 0,1 % Tween 20 verdünnt und nach Gebrauch verworfen. Die Antikörper für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden jeweils einmalig verwendet.

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>		
anti- IE1 (Maus) monoklonal	1:200 IF 1:1000 WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
anti-pUL44 (pp52, Maus) monoklonal	1:200 IF 1:1000 WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
anti-UL83 (pp65, Maus)	1:16000 WB 1:3200 IF	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
anti-pUL99 (pp28, Maus) monoklonal	1:200 IF 1:1000 WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
anti-pUL89 (Maus) monoklonal	1:200 IF 1:1000 WB	Prof. Dr. Stipan Jonjic, Med. Fakultät, Universität von Rijeka (Rijeka, Kroatien)
anti-GAPDH (Maus)	1:5000 WB	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
anti-Lamin A+C (Kaninchen)	1:5000 WB 1:200 IF	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Extravidin-HRP	1:1000 WB	Sigma-Aldrich (München)

## Materialien

### Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen-Alexa-647 (Esel) IgG H+L	1:200 IF	Life Technologies (Carlsbad, USA)
anti-Kaninchen IgG H+L (Ziege), HRP-konjugiert, polyklonal	1:1000 WB	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Anti-Maus-Alexa-488 (Esel) IgG H+L polyklonal	1:200 IF	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, USA
Anti-Maus-Dylight-549 konjugiert AffiniPure	1:200 IF	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, USA
anti-Maus IgG H&L (Ziege), HRP-konjugiert polyklonal	1:5000 WB	Abcam (Cambridge, Großbritannien)

### 3.1.7 Enzyme, Standardmarker und Kits

#### 3.1.7.1 Restriktionsendonukleasen Typ II inkl. 10x-Puffer und Enzyme

<i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>CIP</i> (Calf-Intestinal-Phosphatase)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>Clal</i> (FastDigest)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>DNase I</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>DpnI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
<i>Not I-HF</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
<i>T4-DNA-Ligase</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
<i>XbaI</i> (FastDigest)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

## Materialien

### 3.1.7.2 DNA-Polymerase inkl. 5x- bzw. 10x-Puffer

<i>Pfu</i> -Plus-DNA-Polymerase	EURx Ltd. (Danzig, Polen)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
DreamTaq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

### 3.1.7.3 DNA-Standardmarker

Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	(New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Lambda PFGE Marker	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

### 3.1.7.4 Protein-Standardmarker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

### 3.1.7.5 Kits

Basic Nucleofector™	
Kit for Primary Mammalian Fibroblasts	Lonza Group AG (Köln)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel (Düren)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research (Freiburg)

## Materialien

### 3.1.8 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet von der Firmen Carl-Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Invitrogen AG (Karlsruhe), Honeywell-Fluka (Bucharest, Rumänien), Sigma-Aldrich (München), Plano GmbH (Wetzlar), Biomol GmbH (Hamburg), Ferak Berlin GmbH (Berlin), Merck KGaA (Darmstadt), Southern Biotech (Birmingham, USA), Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Bio-Rad Laboratories GmbH. (München), Nippon Genetics EUROPE GmbH (Düren), Polysciences Europe GmbH (Hirschberg an der Bergstraße), InvivoGen (San Diego, USA) und Ted Pella Inc. (Redding, USA) bezogen.

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die Verbrauchsmaterialien der Firmen Merck Millipore (Darmstadt), Plano GmbH (Wetzlar), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht), Carl-Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Corning Inc. (Kaiserslautern), GE Healthcare (München), Schott AG (Mainz), Simport Scientific Ltd. (Saint-Mathieu-de-Beloeil, Quebec, Kanada), Brand GmbH + Co. KG (Wertheim), Th. Geyer GmbH & Co. LG (Renningen), Beckman Coulter (Brea, USA), VWR International (Radnor, USA) verwendet.

### 3.1.10 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3: Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Gerät	Hersteller
Axiovert 10 inverses Auflichtmikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Branson Sonifier 450	G. Heinemann Ultraschall- und Labor-technik (Schwäbisch Gmünd)
Consort EV243 Electrophoresis power supply	Carl-Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen)
CCD ( <i>charge coupled device</i> )- Kamera + Fusion SL	Vilber Lourmat (Eberhardzell) + Peqlab Biotechnologie GmbH (Darmstadt)
Einfrier-Behälter	Nalgene (Schwerte)
EM T109	Carl Zeiss AG (Oberkochen)

## Materialien

Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Centrifuge R5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf-Research-Einkanal-Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg)
Feinwaage Analytica AC210 P	Sartorius AG (Göttingen)
Gel doc XR+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Horizontales Elektrophoresesystem	Universitätswerkstatt (Erlangen)
Inkubationsrad	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt)
Innova 4330 Schüttelinkubator (Refrigerated incubator shaker)	New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)
Megafuge R 1.0	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG (Hanau)
MicroPulser Elektroporator	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Mikro 120 Centrifuge	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)
NanoDrop-ND-1000-UV/Vis-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH (Darmstadt)
Neubauer-Zählkammer improved	Paul-Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Nucleofector™ 2b	Lonza Group AG (Köln)
Optima L-90K Ultrazentrifuge incl. SW32 Ti-Rotor	Beckman Coulter (Brea, USA)
PFGE Apparatur	Pharmacia Biotech AG (Uppsala, Schweden)
pH Meter 358	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW (Weilheim)
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Rotilabo®-Mini-Zentrifuge (Uni-fuge“	Carl-Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Shaker KM-2	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Sicherheitswerkband Antai BSK-4 MP	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG (Hanau)
Sunrise absorbance reader	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
TCS SPE	Leica Camera AG (Wetzlar)

## Materialien

TE70XP Semi-dry Blotter	Hoefer Inc. (Holliston, USA)
Thermocycler Primus 25 advanced	Peqlab Biotechnologie GmbH (Darmstadt)
Thermo Shaker TS-100	A. Hartenstein GmbH (Würzburg)
Vertikales Elektrophoresesystem	Universitätswerkstatt (Erlangen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Waage MC1 Laboratory LC 1200 S	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)

### 3.1.11 Software

Tabelle 4: Zusammenfassung der verwendeten Software.

Software	Hersteller
CLIQS	Totallab Ltd. (Newcastle upon Tyne; Großbritannien)
DP-Bind	Universität von Albany (Albany, USA)
Finch TV	Geospiza (Seattle, USA)
Fusion	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell)
GYM 2.0	Florida International Universität
Helix-Turn-Helix Motif Prediction	PRABI-Lyon-Gerland (Lyon, Frankreich)
Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
LAS X	Leica Camera AG (Wetzlar)
Magellan 7.2	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	Pennsylvania State Universität (State College, USA)
ND-1000 V3.8.1	Peqlab Biotechnologie GmbH (Darmstadt)
Oligo Calculator	Universität von Kalifornien, Berkeley (Berkeley, USA)
Phoretix 1D	Totallab Ltd. (Newcastle upon Tyne; Großbritannien)
Phyre2	Imperial College London (London, Großbritannien)



## Materialien

PSIPRED	Universität College London (London, Großbritannien)
Reverse and/ or complement DNA sequences	Harvard Universität (Cambridge, USA)
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC (San Diego, USA)
UCSF Chimera 1.10.2	RBVI (UCSF, San Francisco, USA)
ZF Tools Version 3	Scripps Research (San Diego, USA)

### 3.1.12 Kulturmedien

Fötales Rinderserum (FBS) (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

#### EMEM für Zellkulturen

Eagle's Minimum Essential Medium (Lonza Group AG, Köln)

ohne L-Glutamin

mit 25 mM HEPES

versetzt mit:

L-Glutamin (100x-Stocklösung, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Gentamycin (50 mg/ ml Stocklösung, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x-Stocklösung, Sigma-Aldrich, Hamburg)

Natrium-Pyruvat (100 mM Stocklösung, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

#### DMEM für Zellkulturen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza Group AG, Köln)

ohne 4,5 g/ l Glukose

versetzt mit:

L-Glutamin (100x-Stocklösung, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Gentamycin (50 mg/ ml Stocklösung, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

#### Methocel für Zellkulturen

180 ml L2

20 ml 10x-MEM (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

2 ml Glutamin (100x-Stocklösung, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

200 µl Gentamycin (50 mg/ ml Stocklösung, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

5,8 ml Natriumbicarbonat (7,5 % Stocklösung, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

15 ml FBS (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

#### L1-für Methocel (steril filtriert)

7,8 g CaCl<sub>2</sub>

8 g/ l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

ad 200 ml ddH<sub>2</sub>O.

## Materialien

### L2 für Methocel (autoklaviert)

10 g Methylcellulose (Sigma-Aldrich, München)  
10 ml L1  
ad. 2 l ddH<sub>2</sub>O

### lysogeny broth-Medium (LB-Medium) für Bakterien

10 g Pepton/ Trypton  
5 g NaCl  
5 g Hefeextrakt  
ad. 1 l dH<sub>2</sub>O

Für die Herstellung von Agar-Platten wurden 15 g Agar-Agar auf einen Liter LB-Medium hinzugegeben. Der Ansatz wurde autoklaviert (20' bei 121°C, 2 bar) und bei einer Temperatur von 50°C wurde das Antibiotikum hinzugegeben.

### PBS (pH 7,4, phosphatgepufferte Salzlösung, *phoshat buffered saline*)

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ddH<sub>2</sub>O

### **3.1.13 2-Bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole (BDCRB)**

BDCRB gehört zur Klasse der Benzimidazol-D-Ribonukleoside wurde im Labor von Leroy B. Townsend, Universität von Michigan (USA) synthetisiert. Stocklösungen von 5 mg/ ml in DMSO wurde bei -80°C gelagert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Oligonukleotide, welche in der ortsgerichteten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) von pcDNA-UL89 eingesetzt wurden, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zur Konstruktion und Analyse wurden die Programme *Oligo Calculator* (Universität von Kalifornien, Berkeley, USA) *Revers and/ or complement DNA sequences* (Harvard Universität, Cambridge, USA) sowie *Snapgene Viewer 4.2.11* (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) verwendet. Die Synthese erfolgte durch die Firma Invitrogen AG (Karlsruhe).

Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese.

#### Oligonukleotide Sequenz [5' → 3']

##### Primer für DNA-Bindungsuntersuchungen

UL89E534A_fw	GCATCGCCGTGGCGGGCAACACCAACCAGGC
UL89E534A_rev	CGTAGCGGCACCGCCCGTTGTGGTTGGTCCG
UL89R544A_fw	CAGGCGGCGGCCGTGGCCATCGCCTGCCTCATC
UL89R544A_rev	GTCCGCCGCCGGCACCGGTAGCGGACGGAGTAG
UL89H565A_fw	GTCGCGCTCTTCTACGCCACGCCCGACCAGAAC
UL89H565A_rev	CAGCGCGAGAAGATGCGGTGCGGGCTGGTCTTG
UL89H571A_fw	CGCCCGACCAGAACGCCATCGAACAGCCCTTC
UL89H571A-rev	GCGGGCTGGTCTTGCGGTAGCTTGTGCGGAAG

##### Primer für Nuklease-Untersuchungen

UL89D463A_fw	GACGCTTTACGTGTATCTGGCCCCGGCCTTCACCACCAACC
UL89D463A_rev	CTGCGAAATGCACATAGACCGGGGCCGGAAGTGGTGGTTGG
UL89D651A_fw	CGCCCAAGCGCCAGAATCGTATCTCGGACGCTCTTATCATCGCCG
UL89D651A_rev	GCGGGTTCGCGGTCTTAGCATAGAGCCTGCGAGAATAGTAGCGGC

Folgende Probenansätze wurden für die ortsgerichtete Mutagenese verwendet.

## Molekularbiologische Methoden

**Tabelle 6: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die ortsgerichtete Mutagenese.**

Komponente	Volumen [µl]
10x-Pfu-DNA-Polymerase-Puffer / 5x-Phusion GC bzw. HF-Puffer	5/10
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	4
10 µM Primer fw	1
10 µM Primer rev	1
Template-DNA (376,4 ng/ µl)	1
(100 % DMSO)	(2)
5 U/ µl Pfu-Plus-DNA-Polymerase/ 2 U/ µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5/1
ad ddH <sub>2</sub> O	50

Unter Verwendung der folgenden Thermocycler-Einstellung wurde die ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt.

**Tabelle 7: Thermocycler-Einstellungen für die ortsgerichtete Mutagenese-PCR.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenanzahl
einleitende Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Hybridisierung	35-76	1 min	17
Extension	68	12 min	
Final Extension	68	7 min	1
Kühlung	8	unbegrenzt	-

Die Sanger-Sequenzierung<sup>78</sup> der klonierten Plasmidkonstrukte erfolgte durch die Firma LGC Genomics (Berlin). Bevor die Proben versendet wurden, wurde die Plasmid-Konzentration mittels NanoDrop-ND-1000 UV/ Vis-Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) bestimmt. Die Plasmide wurden mit einer Konzentration von 100 ng/ µl verschickt. Die verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

### 3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch das NanoDrop-ND-1000UV/ Vis-Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt), welches die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm misst. Bei der Durchführung der Messung wurde 1,5 µl Nuklease-freies Wasser als Leerwert bzw. 1,5 µl unverdünnte Probe verwendet. Der Reinheitsgrad der Probe wurde anhand der Quotienten der optischen Dichten (OD) OD260 nm/ OD280 nm und OD260 nm/ OD230 nm bestimmt. OD260 nm/ OD280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung durch Proteine, während OD260 nm/ OD230 nm ein Indikator für Kontaminationen durch Phenol

oder Polysaccharide ist. Ein Wertebereich zwischen 1,8 und 2,0 für OD260 nm/ OD280 nm bzw. 2,0 und 2,2 für OD260 nm/ OD230 nm deutet auf reine Proben hin.

### 3.2.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte sofern nicht anders angegeben auf einem 1 % Agarosegel. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x-Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (s. 10x-TBE-Puffer) verwendet, in welchem die Agarose durch Erhitzen gelöst und anschließend mit Midori Green (Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren) versetzt wurde. Je nach Probe und Versuch wurden 1-35 µl Probe mit 6x-DNA-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Entsprechend des Versuches wurde die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 120 V -200 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Visualisierung und Dokumentation der Nukleinsäure-Banden mit Hilfe eines Gel doc XR+ System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

#### 10x-TBE-Puffer (pH 8,0)

892 mM	Tris
889 mM	Borsäure
25 mM	EDTA
	ad dH <sub>2</sub> O

#### 6x-DNA-Ladepuffer

0,25 %	Bromphenolblau
40 %	Glycerin
0,25 %	Xylencyanol
	ad dH <sub>2</sub> O

### 3.2.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus TBE-Agarosegelen

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus TBE-Agarosegelen wurde mit Hilfe des Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-up Kit der Firma Macherey Nagel durchgeführt. Zu Beginn wurde die Probe auf einem 1 % TBE-Agarosegel aufgetrennt und dann nach Herstellerangaben mit Hilfe des Kits isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss photometrisch mittels eines NanoDrop-ND-1000UV/ Vis-Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt).

### 3.2.1.5 Restriktion von doppelsträngiger DNA (dsDNA) mittels Restriktionsendonukleasen

Nach erfolgter ortsgerichteter Mutagenese wurde ein Abbau des Parentalstranges der DNA mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) durchgeführt. Die Spezifität von *DpnI* zeichnet sich durch den Abbau von methylierter und hemimethylierter DNA aus, sodass es zur Selektion zwischen parentaler Template-DNA und mutierter DNA eingesetzt werden kann.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

40 µl	PCR-Produkt
6 µl	10x-Tango-Puffer
1 µl	<i>DpnI</i>
	ad 60 µl ddH <sub>2</sub> O

Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1,5 h.

### 3.2.1.6 Transformation von *E. coli DH5α*

Die Transformation der kompetenten *E. coli DH5α* (s. Seite 13) wurde mit der Hitzeschockmethode durchgeführt. Die auf Eis aufgetauten 100 µl Aliquots der kompetenten *DH5α* wurden mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. 20-30 µl des Restriktionsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock bei 42°C für 90 s durchgeführt und 1 ml vorgewärmtes LB-Medium (s. Seite 28) hinzugegeben. Die Bakteriensuspension wurde bei 37°C für 1 h und 250 Umdrehungen/ Minute (U/ min) inkubiert und im Anschluss 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten (s. Seite 28) mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ ml) ausplattiert. Der verbleibende Transformationsansatz wurde bei 4656 x g für 1 min sedimentiert und das Sediment in 100 µl frischem LB-Medium resuspendiert. Es erfolgte ebenfalls eine Ausplattierung auf einer Antibiotika-versetzten LB-Agarplatte. Die Inkubation der LB-Amp-Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 3.2.1.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde das PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) verwendet. Als Ausgangskultur kam eine 5

ml-Übernachtskultur des transformierten Plasmids in *E. coli* DH5 $\alpha$  zum Einsatz. Die DNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben mit einem Elutionsvolumen von 75  $\mu$ l. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss photometrisch mittels des NanoDrop-ND-1000UV/ Vis-Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt).

### 3.2.1.8 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurde mittels des Kits ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit der Firma ZymoResearch (Freiburg im Breisgau) durchgeführt. Zunächst wurde eine 3 ml Übertagkultur des transformierten Plasmids in *E. coli* DH5 $\alpha$  angesetzt, mit derer die 150 ml Übernachtskultur im Verhältnis von 1:1000 inokuliert wurde. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Abschließend wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des NanoDrop-ND-1000UV/ Vis-Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) durchgeführt.

### 3.2.1.9 *En Passant* Mutagenese

Die folgenden Oligonukleotide (s. Tabelle 8) wurden für die *En Passant* Mutagenese des TB40/E-BAC4 (s. Seite 12) in *E. coli* GS1783 (s. Seite 13) verwendet. Zur Konstruktion und Analyse wurden die Programme *Oligo Calculator* (Universität von Kalifornien, Berkeley, USA) sowie *Revers and/ or complement DNA sequences* (Harvard Universität, Cambridge, USA) angewendet. Die Synthese erfolgte durch die Firma Integrated DNA Technologies (Coralville, USA).

Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide für *En Passant* Mutagenese.

Oligonukleotide	Sequenz [5' $\rightarrow$ 3']
BAC_TB40/E_UL89_E534A_fw	GCCTGCACCCTTACCTGGACGAACTGCG- TATCGCCGTGGCGGGCAACACCAACCAGGC GGAGGATGACGACGATAAGTAGGG
BAC_TB40/E_UL89_E534A_rev	CAGGCGATGCGCACGGCCGCCGCTGGTT- GGTGTTCGCCGCCACGGCGATACGCAGTTC GCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
BAC_TB40/E_UL89_R544A_fw	CGCCGTGGAGGGCAACACCAAC- CAGGCGGCGGCCGTGGCCATCGCCTGCCT CATCCGAC AGGATGACGACGATAAGTAGGG

## Molekularbiologische Methoden

BAC_TB40/E_UL89_R544A_rev	GTGCTGCTCTGCACGCTCTGTCTG- GATGAGGCAGGCGATGGCCACGGCCGCCG CCTGGTTGCAACCAATTAAC- CAATTCTGATTAG
BAC_TB40/E_UL89_H565A_fw	GCGTGCAGAGCAGCAC- GCTCATCCGCGTGCTCTTCTACGCCACGCC CGACCAGAACCACATCAGGATGACGACGA- TAAGTAGGG
BAC_TB40/E_UL89_H565A_rev	GAGGTAGAAGGGCTGTTTCGATGTGGTTCTG GTCGGGCGTGGCGTAGAAGAGCACGCG- GATGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
BAC_TB40/E_UL89_H571A_fw	CATCCGCGTGCTCTTCTACCACAC- GCCCCAGCAGAACGCCATCGAACAGCCCTT CTAC AGGATGACGACGATAAGTAGGG
BAC_TB40/E_UL89_H571A_rev	CCTT- GTCGCGGCCCATGAGGTAGAAGGGCTGTTC GATGGCGTTCTGGTCGGGCGTGTGCAAC- CAATTAACCAATTCTGATTAG
BAC_TB40/E_UL89_E534A,R544A_fw	CTCGGTGCTGAGCCTGCACCCTTACCTG- GACGAACTGCGTATCGCCGTGGCGGGCAAC ACCAACCA- GGCGGCGGCCGTGGCCATCGCCTGCCTCA TCCGACAGAGCGAGGATGACGAC
BAC_TB40/E_UL89_E534A,R544A_rev	GCGGATGAGCGTGCTGCTCTGCAC- GCTCTGTGGATGAGGCAGGCGATGGCCAC GGCCGCGCCTGGTTGGTGTT- GCCCCGCCACGGCGATACGCAGTTCGTCCAG GCAACCAATTAACC
BAC_TB40/E_UL89_H565A,H571A_fw	CGACAGAGCGTGACAGAGCAGCACGCTCA- TCCGCGTGCTCTTCTACGCCACGCCCGACC AGAACGCCATCGAACAGCCCTTCTACCTCA- TGG AGGATGACGACGATAAGTAGGG
BAC_TB40/E_UL89_H565A,H571A_rev	CGGCCAGCGCCTT- GTCGCGGCCCATGAGGTAGAAGGGCTGTTC GATGGCGTTCTGGTCGGGCGTGGCG- TAGAAGAGCACGCGGATGAGCGTGCAACCA ATTAACCAATTCTGATTAG



## Molekularbiologische Methoden

### Oligonukleotide für die Überprüfung der Kanamycin-Resistenzgen-Integration Sequenz [5' → 3']

EcoR1-3HA-Xho-UL89-fw	CGATGAATTCCATGGGCCG- CATCTTTTACCCATACGATGTTCTGACTAT GCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGAC- TATGCAGGTTCTATCCATATGACGTTCCAG ATTACGCTGCTCAGCTCGAGATGTTGCGCG- GAGACTCG
Bam-UL89-rev	CGTAGGATCCCTAGCTGACCCTGAAAC- GGATGG

Folgende Probenansätze wurden für die *En Passant* Mutagenese eingesetzt. Das Plasmid pEPkan-S (s. Seite 15-16) wurden bei dieser Reaktion als *Template*-DNA verwendet (s. Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die *En Passant* Mutagenese.**

Komponente	Volumen [µl]
10x-DreamTaq-Polymerase-Puffer	10
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	8
4 nM Primer fw	0,5
4 nM Primer rev	0,5
Template-DNA pEPkan-S (1000 ng/ µl)	1
DreamTaq-DNA-Polymerase	1
ad. ddH <sub>2</sub> O	100

Die folgenden Thermocycler-Einstellungen wurden für die *En Passant* Mutagenese gewählt (s. Tabelle 10).

**Tabelle 10: Thermocycler-Einstellungen für die *En Passant* Mutagenese.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenanzahl
einleitende Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 s	
Hybridisierung	55-65	1 min	31
Extension	68	3 min	
Final Extension	72	7 min	1
Kühlung	15	unbegrenzt	1

Die Transformation des PCR-Fragments in die rekombinations- und elektrokompetenten *E. coli* GS1783 erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten *E. coli* GS1783 mit 100 ng PCR-Produkt versetzt und in eine vorgekühlte

## Molekularbiologische Methoden

Elektroporationsküvette überführt. Anschließend erfolgte sofort die Elektroporation mit den Einstellungen 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$ . Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen zügig mit 1 ml LB (s. Seite 28) aus den Küvetten entfernt und für 1-2 h bei 30°C und 180 U/ min inkubiert. Es schloss sich eine Sedimentation des Ansatzes für 1 min, bei RT und 10.000 x g an. Das Sediment wurde in 100  $\mu$ l LB resuspendiert und auf LB Agar-Platten (s. Seite 28) mit 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol und 30  $\mu$ g/ ml Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 48 h bei 30°C inkubiert. Die Integration der Kanamycin-Kassette wurde durch eine PCR überprüft. Die Zusammensetzung sowie die Bedingungen der PCR sind in den Tabellen 11 und 12 zusammengefasst.

**Tabelle 11: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Überprüfung der Kanamycin-Resistenzgen-Integration.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
10x-DreamTaq-Polymerase-Puffer	2
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1,6
4 nM EcoR1-3HA-Xho-UL89-fw	0,1
4 nM Bam-UL89-rev	0,1
Template-DNA (1000 ng/ $\mu$ l)	0,2
DreamTaq-DNA-Polymerase	0,2
ad ddH <sub>2</sub> O	20

**Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Überprüfung der Kanamycin-Resistenzgen-Integration.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklusanzahl
einleitende Denaturierung	95	8 min	1
Denaturierung	95	30 s	33
Hybridisierung	55	30 s	
Extension	72	2 min	
Final Extension	72	10 min	1
Kühlung	15	Unbegrenzt	1

Mit den positiven Klonen wurde eine LB-Flüssigkultur, versetzt mit 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol, angesetzt und für 1 bis 2 h bei 30°C und 180 U/ min inkubiert. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes LB mit 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol und 2 % L-Arabinose hinzugegeben und erneut für 1 h bei 180 U/ min und 30°C inkubiert. Die Kulturen wurden im Anschluss in ein 42°C warmes Wasserbad überführt und mit 220 U/ min für 30 min inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 2,5 h bei 30°C. 10  $\mu$ l dieser Kulturen wurden auf LB-Agar-Platten mit 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol und 1 % L-Arabinose ausplattiert und für 48 h bei 30°C inkubiert. Um die erfolgreiche Entfernung der Kanamycin-Kassette zu überprüfen, wurden Einzelkolonien auf je einer LB-Agar-Platte mit 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol bzw. 30  $\mu$ g/ ml Chloramphenicol und 30  $\mu$ g/ ml Kanamycin ausgestrichen und für 48 h bei 30°C inkubiert. Positive Klone können nur auf

der LB-Agar-Platte mit 30 µg/ ml Chloramphenicol wachsen. Eine endgültige Überprüfung erfolgte mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung<sup>78</sup> durch LGC Genomics GmbH (Berlin). Die verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

### 3.2.1.10 Next-Generation-Sequencing (Illumina MiSeq<sup>79</sup>)

Sowohl die präparierte BAC-DNA als auch die extrahierte virale DNA (3.2.2.13.) wurde abschließend durch die Firma Seq-IT GmbH u. Co. KG (Kaiserslautern) vollständig sequenziert. Dazu wurden 1 µg BAC-DNA bzw. die gesamte Menge an extrahierter viraler DNA versendet. Die Firma führte eine *Illumina NExtera XT library preparation* und das *Mapping* durch.

### 3.2.1.11 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente wie z.B. viraler oder bakterieller DNA über das Anlegen elektrischer Impulse in einem wechselnden Winkel von je 60° zur Laufrichtung.

Zur Überprüfung der korrekten Spaltung der konkatemeren, viralen DNA wurden HELF Fi301-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit TB40/E oder den Virusmutanten mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 3 infiziert und 96 h p.i. (*hours post infection*) geerntet. Zunächst wurden die Zellen einmal mit kalten PBS (s. Seite 28) gewaschen und anschließend in 2 ml PBS aufgenommen. Es erfolgte die Sedimentation (1400 x g, 10 min, 4°C) und Resuspension in 200 µl L-Puffer. Die Zellsuspension wurde mit 250 µg/ ml Proteinase K und 200 µl 2 % LMP-Agarose (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) versetzt und in Blockform abgekühlt. Die Zelllyse erfolgte in 1,5 ml Lysispuffer bei 50°C und 250 U/min über Nacht. Dabei wurde der Lysispuffer nach 3 h gegen frischen Puffer getauscht. Am nächsten Tag wurde der Lysispuffer erneut ausgetauscht und die Proben für 5 h bei 50°C und 250 U/min inkubiert.

Die Neutralisation der Proteinase K erfolgte durch dreimaliges Waschen für 1 h mit TE-Puffer. Die Hälfte der Proben wurde für einen Restriktionsverdau mit *NotI-HF* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) eingesetzt.

## Molekularbiologische Methoden

Folgender Ansatz wurde verwendet:

- 15 µl 10x-NEB2-Puffer
- 1,5 µl 100x-BSA (Bovines Serumalbumin)
- 50 U Not I
- ad 150 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Proben in 0,5x-TBE (s. Seite 31) für 2x 30 min äquilibriert. Die Agarose-Blöcke sowie ein Lambda PFG Marker (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) wurden in die Taschen eines 1 % LMP-Agarosegels eingebracht und die Taschen mit 2 % LMP-Agarose verschlossen. Die Elektrophorese fand in 0,5x-TBE für 20 h bei 14°C mit einem Pulswinkel von 60° bei 10 V/ cm Laufstrecke statt. Abschließend wurde das Gel für 30 min in 0,5x-TBE und 10 µl Midori Green (Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren) gefärbt, sowie für 30 min in 0,5x-TBE entfärbt und fotografiert. Die folgenden Pulszeiten wurden für die PFGE verwendet.

- 10 s → 5 h
- 25 s → 5 h
- 50 s → 5 h
- 80 s → 3 h
- 120 s → 2 h

### L-Puffer

- 10 mM Tris/ HCl pH 7,5
- 20 mM NaCl
- 100 mM EDTA
- ddH<sub>2</sub>O

### Lysispuffer

- L-Puffer +
- 1 % N-Lauroylsarcosine
- 100 µg/ ml Proteinase K
- ddH<sub>2</sub>O

### TE-Puffer

- 10 mM Tris/ HCl pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 1 mM PMSF
- ddH<sub>2</sub>O

### 3.2.1.12 Klonierung einer komplementierenden Zelllinie

Für die Herstellung der Zelllinie wurde das Lentivirus-Expressionssystem verwendet. Dazu wurden in den Ausgangsvektor pCDH-CMV-MCS-EF1-puro (s. Abb. 7, Seite 16-17) die Sequenzen für *UL89* sowie für den viralen Promotor dieses ORF inseriert.

## Molekularbiologische Methoden

Im ersten Schritt wurde das *UL89*-Gen in den Lentivektor eingefügt. Dazu wurde das *Insert* aus pcDNA-89 mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen, sowie die verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 13, 14 und 15 zusammengefasst.

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide für Herstellung einer komplementierenden Zelllinie.

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'
fw_UL89_EcoRI	CGG/AATTCATGTTGCGCGGAGACTC
rev_UL89_BamHI	CG/GGATCCCTAGCTGACCCTGAAACG
fw_UL89prom_ClaI	CCAT/CGATACTAGTCACCTCGGCCGACTCGCGC
rev_UL89prom_XbaI	TGCT/CTAGAGATGGCGGCGGCGGTGGTGGCAGC
Sequenzierungsprimer	Sequenz 5' → 3'
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
pUL89_fw-Seq-933	CACTTCATCAAGAAAGAGGCC
Seq_pCDH_puro_CTS_fw	GACAGATCCATTTCGATTAGTGAAC
UL89_215_Seq_rev	TTTCCTCGGGCGAGTTGTAG

Tabelle 14: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung des *UL89*-Gens.

Komponente	Volumen [µl]
5x-GC-Phusion-Polymerase-Puffer	10
10 mM dNTP-Mix	1
10 µM fw_UL89_EcoRI	1
10 µM rev_UL89_BamHI	1
pcDNA-89 (Template)	1
100 % DMSO	1,5
2U/ µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5
ad ddH <sub>2</sub> O	50

Tabelle 15: PCR-Bedingungen für die Amplifizierung des *UL89*-Gens.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenanzahl
einleitende Denaturierung	98	30 s	1
Denaturierung	98	10 s	
Hybridisierung	70,6	30 s	30
Extension	72	1,5 min	
Final Extension	72	5 min	1
Kühlung	8	Unbegrenzt	1

Nach erfolgter Amplifizierung erfolgte die Restriktion des Vektor pCDH-CMV-MCS-Ef1-puro, sowie des *Inserts* mit *EcoRI* und *BamHI* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte). Folgende Ansätze wurden verwendet:

## Molekularbiologische Methoden

1 µg Vektor  
2 µl FastDigest Puffer  
1 µl FastDigest *EcoRI*  
1 µl FastDigest *BamHI*  
ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

200 ng Insert  
2 µl FastDigest Puffer  
1 µl FastDigest *EcoRI*  
1 µl FastDigest *BamHI*  
ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Restriktion erfolgte bei 37°C für 15 min (Vektor-Ansatz) bzw. 20 min (Insert-Ansatz). Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 5 min bei 80°C inaktiviert und eine Dephosphorylierung des Vektor-Ansatzes durch die Zugabe von 2 µl 10 U/ µl *CIP* (*Calf-Intestinal-Phosphatase*, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C. Die Ansätze wurde im Anschluss mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery Nagel, Düren) aufgereinigt und eine Ligation bei 16°C über Nacht durchgeführt. Die Ligationsbedingungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Ligationsansätze.**

	<b>Ligase Puffer [µl]</b>	<b>Vektor [ng]</b>	<b>Insert [ng]</b>	<b>T4-DNA- Ligase [µl]</b>	<b>ad ddH<sub>2</sub>O [µl]</b>
<b>1:1</b>	2	25	6,8	1	20
<b>1:3</b>	2	25	20,6	1	20
<b>1:5</b>	2	25	34,3	1	20

Abschließend erfolgte die Transformation von 10 µl Ligationsansatz in 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* DH5α.

Zur Überprüfung der positiven Kolonien, wurde eine Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden fw\_UL89\_EcoRI und rev\_UL89\_BamHI unter den gleichen Bedingungen, wie in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst, durchgeführt. Die endgültige Verifizierung erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung<sup>78</sup> durch die Firma LGC Genomics (Berlin) unter Verwendung der Sequenzier-Oligonukleotide CMV-F und pUL89\_fw-Seq-933 (s. Tabelle 1).

Anschließend erfolgte die Insertion der viralen Promotorregion. Zunächst erfolgte erneut die Klonierung des zweiten *Inserts*. Als Ausgangsmaterial wurde das Wildtyp-BAC für TB40/E (BAC 4) verwendet. Die spezifischen Oligonukleotide sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die PCR wurde wie in den Tabellen 17 und 18 aufgelistet durchgeführt.

## Molekularbiologische Methoden

**Tabelle 17: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der Promotorregion von UL89.**

Komponente	Volumen [µl]
5x-GC-Phusion-Polymerase-Puffer	10
10 mM dNTP-Mix	1
10 µM fw_UL89prom_ClaI	1
10 µM rev_UL89prom_XbaI	1
BAC 4 (TB40/E)	1
100 % DMSO	1,5
2 U/ µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5
ad ddH <sub>2</sub> O	50

**Tabelle 18: PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der Promotorregion.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenanzahl
einleitende Denaturierung	98	30 s	1
Denaturierung	98	10 s	
Hybridisierung/ Extension	72	30 s	30
Final Extension	72	5 min	1
Kühlung	8	Unbegrenzt	1

Anschließend erfolgte die Restriktion des Inserts und des Vektor pCDH-CMV-UL89-EF1-puro mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *XbaI* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte). Folgender Ansatz wurde eingesetzt:

1 µg Vektor	200 ng Insert
2 µl Tango-Puffer Puffer	2 µl Tango-Puffer
1 µl <i>ClaI</i>	1 µl <i>ClaI</i>
1 µl <i>XbaI</i>	1 µl <i>XbaI</i>
ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Im Anschluss wurde der Vektor dephosphoryliert durch die Zugabe *CIP*. Abschließend erfolgte die erneute Aufreinigung über das Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery-Nagel, Düren) und eine Ligation über Nacht bei 16°C. Die Zusammensetzung der Ligationsansätze ist in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19: Zusammenfassung der verwendeten Ligationsansätze.**

	Ligase Puffer [µl]	Vektor [ng]	Insert [ng]	T4-DNA- Ligase [µl]	ad ddH <sub>2</sub> O [µl]
<b>1:1</b>	2	25	1,39	1	20
<b>1:3</b>	2	25	4,17	1	20
<b>1:5</b>	2	25	6,94	1	20

Die Transformation von 10 µl Ligationsansatz erfolgte in 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* DH5α. Zur Identifizierung der positiven Klone wurde erneut eine Kolonie-PCR

## Molekularbiologische Methoden

durchgeführt unter Verwendung der Oligonukleotide fw\_UL89prom-ClaI und rev\_UL89prom\_XbaI. Zur endgültigen Kontrollen wurden die Klone durch die Firma LGC Genomics (Berlin) unter Verwendung der Sequenzier-Oligonukleotide Seq\_pCDH\_puro\_CTS-fw und UL89\_215\_Seq\_rev Sanger-sequenziert<sup>78</sup> (s. Tabelle 1).

Die generierte Zelllinie HELF Fi301-vProm-UL89 wurde für die Rekonstitutionversuche der wachstums-defiziten BACs TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A verwendet. Die Durchführung ist unter 3.2.2.7. (s. Seite 45-46) beschrieben.



### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  (s. Seite 13) wurde eine LB-Vorkultur (s. Seite 28) über Nacht bei 37°C kultiviert. Mittels dieser Vorkultur erfolgte die Beimpfung und Kultivierung der Hauptkultur am drauffolgenden Tag unter der Kontrolle der optischen Dichte bei 600 nm. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 erfolgte die Sedimentation der Zellen für 5 min bei 4332 x g und 4°C. Das Sediment wurde in 20 ml eiskalten Puffer I resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein zweiter Sedimentationsschritt für 5 min bei 4332 x g und 4°C an. Nach erneuter Resuspension des Sediments in 20 ml eiskalten Puffer II erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 5 min bei 4332 x g und 4°C sedimentiert. Das entstandene Sediment wurde in 2 ml Puffer III gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine Aliquotierung à 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße und eine Lagerung bei -80°C.

##### Puffer I (pH 7,0)

100 mM	MOPS
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
	ddH <sub>2</sub> O

##### Puffer II (pH 6,5)

100 mM	MOPS
70 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
	ddH <sub>2</sub> O

##### Puffer III (pH 6,5)

100 mM	MOPS
70 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
15 %	Glycerin
	ddH <sub>2</sub> O

Die Puffer wurden nach Fertigstellung autoklaviert und vor der Verwendung im Eisbad gekühlt.

#### 3.2.2.2 Herstellung rekombinations- und elektrokompetenter *Escherichia coli* GS1783

Zur Herstellung der rekombinations- und elektrokompetenten *E. coli* GS1783 (s. Seite 13) mit dem TB40/E-BAC4-Klon wurde eine LB-Übernachtskultur (s. Seite 28) mit

## Zellbiologische Methoden

30 µg/ ml Chloramphenicol bei 30°C kultiviert. Diese Übernachtskultur diente der Beimpfung der Hauptkultur am nächsten Tag in einem Verhältnis von 1:50, unter der Beobachtung der optischen Dichte bei 600 nm. Bei einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> 0,5-0,7 erfolgte die Inkubation bei 42°C und 180 U/ min für 15 min. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min im Eisbad inkubiert, sowie für 5 min bei  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  und 4.500 x g sedimentiert. Das entstandene Sediment wurde in 1 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert und erneut für 4 min bei  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  und 4.500 x g sedimentiert. Nach Wiederholung dieses Waschschruttes wurde das Sediment in 50 µl 10 % Glycerin aufgenommen und für die Elektroporation verwendet.

### 3.2.2.3 Allgemeine Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe 2 mit laminaren Luftstrom durchgeführt.

### 3.2.2.4 Kultivierung von humanen Zellen

Zur Kultivierung der humanen Zelllinien HELF Fi301 und HEK-293T (s. Seite 12) wurde ein CO<sub>2</sub>-Inkubator im offenen System mit einer Temperatur von 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit dem Minimalmedium EMEM (s. Seite 27) bzw. dem Universalmedium DMEM (s. Seite 27). Zur Zellpassagierung wurde der konfluent gewachsene Monolayer nach Entfernen des Wachstumsmediums mit PBS (s. Seite 28) gewaschen und anschließend je nach Zellkulturflaschengröße mit 3 ml (75 cm<sup>2</sup>) bzw. 5 ml (175 cm<sup>2</sup>) 0,25 % Trypsin/ EDTA (T/ E) inkubiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Reaktion durch das dreifache Volumen Medium/ 10 % FBS (*fetal bovine serum*, Fötales Rinderserum s. Seite 27) neutralisiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 - 1:5 in eine neue Zellkulturflasche überführt und das fehlende Volumen mit Medium/ 10 % FBS aufgefüllt.

### 3.2.2.5 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben von den Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis von 1:2 mit Medium/ 10 % FBS (s. Seite 27) versetzt. Anschließend wurden 10 µl dieser Zellsuspension auf eine mit einem Deckglas versehene Neubauer-Zählkammer *improved* gegeben und die Zellen der 4 x 4

Quadrate ausgezählt. Aus den vier einzelnen Werten wurde der Mittelwert bestimmt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergab sich aus dem Mittelwert und dem Faktor  $10^4$  die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

### 3.2.2.6 Einfrieren und Auftauen von humanen Zellen

Zum Einfrieren wurden subkonfluente *Monolayer*-Kulturen mit PBS (s. Seite 28) gewaschen und anschließend mit 0,25 % T/ E vom Zellkulturboden abgelöst. Es erfolgte eine Neutralisierung des T/ E mit Hilfe des dreifachen Volumens DMEM/ 10 % FBS (s. Seite 27). Im Anschluss wurde eine Sedimentation der Zellen bei  $100 \times g$  für 7 min bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Abschließend wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Polypypropylenröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden mit Hilfe eines Einfrierbehälters (Nalgene, Rochester, USA) bei  $-80^\circ\text{C}$  langsam ( $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ) eingefroren und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

#### Einfriermedium

DMEM  
20 % FBS  
10 % DMSO

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurde diese aus dem Stickstoff entnommen und zügig mit Hilfe vorgewärmten Mediums (EMEM/ 10 % FBS oder DMEM/ 10 % FBS, s. Seite 27) in ein steriles Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nach der Sedimentation der Zellen bei  $100 \times g$  für 7 min bei RT wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium/ 10 % FBS aufgenommen und auf eine Zellkulturflasche überführt. Das fehlende Medium wurde aufgefüllt und die Zellen in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator inkubiert.

### 3.2.2.7 Rekonstitution von BACs mit dem amaxa® Nucleofector™ 2b

Zur Transfektion der BACs in primäre Fibroblasten (HELFI301) wurde der amaxa® Nucleofector™ 2b der Firma Lonza Group AG (Köln) und das Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Lonza Group AG, Köln) verwendet. Diese Technologie ermöglicht eine effiziente Transfektion von Zellen die auf herkömmliche Weise schwer zu transfizieren sind. Für jeden Transfektions-Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen HELFI301 bzw HELFI301-vProm-UL89 (s. 3.2.1.12 Klonierung einer komplementierenden Zelllinie) verwendet. Die Zellen wurden in 81,8  $\mu\text{l}$  Nucleofector solution und

18,2 µl Supplement gelöst (insgesamt 100 µl pro Ansatz). Pro Ansatz wurden 2,6 µg BAC-DNA, sowie 0,7 µg pcDNA-pp71 verwendet. Das Gemisch wurde blasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt und unter Verwendung des vorinstallierten Programm A-023 elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen zügig mit äquilibrierten EMEM/ 10 % FBS (s. Seite 27) auf eine 6 *well*-Zellkulturplatten überführt und im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium gegen frisches EMEM/ 10 % FBS ausgetauscht. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung eines cytopathischen Effektes (CPE) im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Abschließend wurde ein Virusstock mit Hilfe des Transfektions-Ansatzes hergestellt.

### 3.2.2.8 Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen

Zum Ansetzen der 6-*well* Zellkulturplatten für die transiente Transfektion wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst, mit der Neubauer-Zählkammer *improved* (s. Seite 44-45) gezählt und  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die transiente Transfektion der 70-90 % konfluenten HEK-293T-Zellen wurde mittels des Transfektions-Reagenz Polyethylenimine Max (PEI Max, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße) durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ ml hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge neutralisiert und das Transfektions-Reagenz steril filtriert (0,22 µm Sterilfilter). Für die Transfektion in einer 6-*well* Zellkulturplatte wurden 2 µg des zu transfizierenden Plasmids und 6 µg PEI Max in DMEM/ 5 % FKS (s. Seite 27) eingesetzt. Im Anschluss erfolgte eine 48-stündige Kultivierung der Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2.9 Herstellung rekombinanter Lentiviren

Zur Transduktion von HELF Fi301-Zellen mit Hilfe von Lentiviren wurden 293T-Zellen 1:4 geteilt und in 15 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Vier Stunden nach Aussaat der Zellen erfolgte die Transfektion von 11,6 µg des Expressionsplasmid pCDH-vProm-UL89-EF1-puro, 7,7 µg des Verpackungsplasmid psPAX2 und 5,8 µg des Hüllplasmids pMD2.G mittels 50 µl des Transfektionsreagents PEI Max (1 mg/ ml). 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit EMEM/ 10% FBS (s. Seite 27). Die gebildeten Lentiviren werden in den Überstand abgegeben, welcher nach weiteren 24 h abgenommen wurde. Nach Sedimentation (100 x *g* für 7 min bei RT) und Filtration

über einen 0,45 µm Sterilfilter wurden 10 ml Lentivirus-Überstand mit einer finalen Konzentration von 0,8 µg/ ml Polybrene versetzt. Mit dieser Virussuspension wurden HELF Fi301 in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen über Nacht infiziert. Am nächsten Tag erfolgte eine Selektion der transduzierten Zellen durch Teilung im Verhältnis von 1:2 und der Zugabe von 4 µg/ ml Puromycin als Selektionsmarker.

### 3.2.2.10 Herstellung von Virusstocks

Zur Herstellung von Virusstocks werden konfluente HELF Fi301-Zellen mit einer geringen MOI von ca. 0,01-0,1 infiziert. Nachdem ca. 50 % der Zellen einen CPE ausbilden wird eine Replattierung der Zellen durchgeführt um die Infektion der verbleibenden Zellen zu beschleunigen. Nach ca. fünf bis sieben Tagen kann der Virusüberstand abgenommen und für 7 min bei 100 x g und RT sedimentiert werden. Anschließend erfolgten eine Aliquotierung des Virusstocks und eine Lagerung bei -80°C.

### 3.2.2.11 Experimentelle Virusinfektion der HELF Fi301-Zellen

Zur Infektion von HELF Fi301-Zellen wurde sofern nicht anders angegeben eine MOI von 1 verwendet. Das Wachstumsmedium der Zellen wurde entfernt und die entsprechende Menge an Virussuspension in EMEM wurde zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 90 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Die Virussuspension wurde entfernt und die Zellen wurden mit EMEM/ 2 % FBS (s. Seite 27) überschichtet und im CO<sub>2</sub>-Inkubator bis zu einem bestimmten Zeitpunkt (*post infection*, p.i.) inkubiert.

### 3.2.2.12 Plaque-Reduktionsassay

Zur Bestimmung des Titers eines Virusstocks wurden pro Vertiefung 1\*10<sup>5</sup> HELF Fi301-Zellen mit EMEM/ 10 % FBS (s. Seite 27) in eine 12-well-Zellkulturplatte ausgesät. Es folgte die Inkubation für zwei Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Zur Titer-Bestimmung wurde vom Virusstock eine Verdünnungsreihe von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-7</sup> hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-7</sup> für 90 min infiziert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem wurden zwei Vertiefungen als Negativkontrolle mit 250 µl EMEM inkubiert (*mock*). Nach erfolgter

## Zellbiologische Methoden

Inkubation wurden die Überstände entfernt und die Zellen mit 2 ml Methocel/ *well* überschichtet. Nach siebentägiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator erfolgte die Zellfixierung mit Ethanol: Aceton (95:5) für mindestens 20 min bei -20°C. Anschließend wurden die CPE zur besseren Visualisierung mit 0,2 % Kristallviolett in 20 % Ethanol für 5 min angefärbt. Die Auszählung der gebildeten CPE erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops Axiovert 10 inverses Auflichtmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Die Verdünnungsstufe mit den wenigstens CPE wurde zur Berechnung des Titers herangezogen. Außerdem wurde der Titer unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors pro ml Virusstock berechnet.

### 3.2.2.13 Wachstumskinetik

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens der einzelnen Virusmutanten im Vergleich zum Wildtypvirus TB40/E wurde eine zweistufige Wachstumskinetik durchgeführt. Zunächst wurden HELF Fi301 in 24-*well*-Kulturplatten ausgesät. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben in einer Neubauer-Zählkammer *improved* gezählt (s. Seite 44-45) und  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach zweitägiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die Zellen mit einer MOI von 1 für 90 min infiziert. Anschließend wurde die Virussuspension entfernt, die Zellen zweimal mit PBS (s. Seite 28) gewaschen und mit 500 µl EMEM/ 2 % FBS (s. Seite 27) überschichtet. Die Überstände wurde nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h p.i. abgenommen und bei -80°C gelagert.

Für die weitere Bestimmung der Wachstumseigenschaften wurden HELF Fi301-Zellen in 12-*well*-Kulturplatten ausgesät (s. 3.2.2.13 Plaque-Reduktionsassay, S. 46-47) und mit den Überständen (jeder Zeitwert) für 90 min infiziert. Nach erfolgte Infektion wurden die Überstände entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2 ml Methocel pro Vertiefung (s. Seite 27-28) überschichtet und für sieben Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurde die Fixierung mit Ethanol: Aceton (95:5) für mindestens 20 min bei -20°C, sowie die Visualisierung mit 0,2 % Kristallviolett in 20 % Ethanol für 5 min durchgeführt. Die CPE wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops für jeden Zeitpunkt ausgezählt. Die Werte wurden unter Berücksichtigung von durchgeführten Verdünnungen berechnet, sowie logarithmisch aufgetragen. Es erfolgten mindestens drei unabhängige Bestimmungen.

### 3.2.2.14 Aufreinigung extrazellulärer Virionen und Extraktion der viralen DNA

Zur Aufreinigung von extrazellulären Virionen wird der Überstand von mit TB40/E oder den Histidin-Virusmutanten infizierten HELF Fi301-Zellen in 175 cm<sup>2</sup> –Zellkulturflaschen 168 h p.i. abgenommen. Die Zellfragmente wurden für 10 min bei 2054 x *g* sedimentiert und der Überstand wurde anschließend für 70 min bei 100.000 x *g* und 4°C (SW32 Ti-Rotor, Beckmann, Frankfurt) ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Virussediment in ca. 1 ml verbleibendem Medium resuspendiert. Anschließend wurden 40 U *DNase I* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) zum Ansatz hinzugegeben und dieser für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Endonuklease-Reaktion wurde durch Zugabe von 15 mM EDTA und einer 10-minütigen Inkubation bei 70°C gestoppt. Weiterhin wurden der Ansatz mit 0,5 % SDS und 1 mg/ ml Proteinase K versetzt und für 2 h bei 60°C inkubiert.

Die virale DNA wurde mit Hilfe von Roti-Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) extrahiert. Dazu wurde das gleiche Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol zum Ansatz gegeben und dieser für 1 min gut gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 10.000 x *g* sedimentiert und die wässrige Phase vorsichtig in ein neues Eppendorf-Probengefäß überführt. Anschließend wurden 0,2 M NaCl zu der wässrigen Phase hinzugegeben und invertiert. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt für 30 min bei 4°C und 20.000 x *g* sedimentiert. Abschließend wurde die präzipitierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, die DNA bei RT getrocknet und in 30 µl TE-Puffer rekonstituiert.

#### TE-Puffer

10 mM	Tris/ HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA
	ad ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.3 Immunbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz von fixierten Zellen

Zur Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenz wurden HELF Fi301 in 24 *well*-Zellkulturplatten ( $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Vertiefung), welche im Vorhinein mit Deckgläschen versehen wurden, ausgesät. Nach zweitägiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die Zellen mit einer MOI von 1 für 90 min infiziert. Die Zellen wurden mit 1 ml EMEM/ 2 % FBS (s. Seite 27) überschichtet und bis zu einem bestimmten Zeitpunkt im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen bis zum Zeitpunkt 96 h p.i. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach einmaligen Waschen mit PBS (s. Seite 28) erfolgte die Inkubation für 10 min in 50 mM Ammoniumchlorid in PBS. Darauffolgten wurden die Zellen für 5 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS für je 5 min. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen mit 2 % BSA in PBS für 30 min abgesättigt, gefolgt von drei Waschschrten mit PBS. Nach Entfernen der Deckgläschen aus der Zellkulturplatte wurde die zellbeschichtete Deckgläschenseite in 20 µl Primärantikörper/ PBS-Lösung für 30 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein Waschschrte in PBS und die Inkubation in 20 µl Sekundärantikörper/ PBS-Lösung für 20 min in einer dunklen, feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal in PBS und einmal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. In der Regel handelte es sich um Maus-basierte Primärantikörper, sodass diese Vorgehensweise für alle Antikörper hintereinander, einzeln durchgeführt wurde. Durchschnittlich wurden zwei bis drei Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper, sowie deren Verdünnungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Zur Färbung des Nukleus wurde der Farbstoff DAPI verwendet, welcher bereits zum Fluomount-G zugesetzt vorlag. Es wurde pro Deckgläschen 1 Tropfen Fluomount-G/ DAPI-Lösung auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der zellbeschichteten Seite in den Tropfen eingebettet. Nach Inkubation über Nacht wurden die Ränder der Deckgläschen mit klarem Nagellack versiegelt und bis zur Mikroskopie im Dunkeln aufbewahrt.



### 3.2.3.2 Konfokale Mikroskopie

Zur Visualisierung der indirekten Immunfluoreszenz wurde ein TCS SPE konfokales Mikroskop der Firma Leica Camera AG (Wetzlar) verwendet. Das Mikroskop weist vier Festkörperlaser mit den Wellenlängen 405, 488, 532 und 635 nm auf, sowie ein 10x-Objektiv (trocken) und drei Öl-Immersions-Objektive (20x-, 40x- und 63x-) auf. Des Weiteren umfasst das Equipment des aufrechten Mikroskops einen mechanischen X-Y-Tisch und einen galvanischen Z-Tisch. Die Detektion erfolgt mit LP 425 nm, LP 515 nm und einem LP 590 nm-Filtern. Das Mikroskop wurde freundlicherweise von der NWFZ *Microscopy Core Facility* (MCF) der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 Ernte transfizierter HEK-293T-Zellen

Die Expression des pUL89-Wildtyp-Proteins oder Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub) erfolgte in transient transfizierten HEK-293T-Zellen. Nach 48-stündiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator erfolgte die Ernte der transfizierten Zellen. Nach Entfernung des Wachstumsmedium, wurden die 6-*well*-Platten mit PBS (s. Seite 28) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischen PBS überschichtet und von den Kulturplatten mittels Zellschaber gelöst. Zur Sedimentation wurden die Zellen 10 min bei 2.383 x *g* und RT sedimentiert. Das Zellsediment wurde in Resuspensionspuffer (s. Seite 53) gelöst und ein Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension für 3 x 1 min mit voller Leistung und 4°C sonifiziert. Abschließend wurde eine Sedimentation bei 20.800 x *g* und 4°C für 10 min durchgeführt, um Zelltrümmer vom Zellextrakt zu trennen, sowie eine Bestimmung des Gesamtprotein-gehalts mittels BCA-Kit durchgeführt. Die Zellextrakte wurden bis zur Proteinisolierung und-reinigung bei -20°C gelagert.

#### 3.2.4.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels BCA-Kit

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zellextrakten wurde das Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte) verwendet. Die benötigte Standardreihe wurde nach Angabe der Firma präpariert und umfasst die Konzentrationen von 0 bis 2000 µg/ ml. Es wurde 25 µl der Standardreihe bzw. der Probe verwendet und mit 200 µl des Lösungsgemisches (50:1; Reagenz A: B) für 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die die Mikrotiterplatte bei 562 nm ausgelesen und die Proteinkonzentrationen berechnet.

#### 3.2.4.3 Proteinisolierung und –reinigung

Die Zellextrakte der transient transfizierten HEK-293T-Zellen, welche bei -20°C gelagert wurden, wurden langsam auf Eis aufgetaut und für die Proteinisolierung und –reinigung von pUL89 oder pUL89-sub eingesetzt. Zur Isolierung wurden die Zellextrakte auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ ml verdünnt und für 1 h mit äquilibrierten magnetischen Kügelchen (*His Mag Sepharose Ni Magnetic Beads*, GE Healthcare,

## Proteinbiochemische Methoden

München) bei 5 U/ min und 4°C inkubiert. Die magnetischen Kügelchen wurden mit drei Waschpuffern, welche eine steigende Imidazolkonzentration aufweisen gewaschen (Waschpuffer I 60 mM, Waschpuffer II 150 mM, Waschpuffer III 250 mM). Im Anschluss erfolgte die Elution der gebundenen His<sub>6</sub>-markierten Proteine mit 2x 100 µl Elutionspuffer, welcher 500 mM Imidazol enthält. Es schloss sich ein zweiter Reinigungsschritt über eine PD-midiTrap G-25-Säule (GE Healthcare, München) an. Die PD-Säule wurde vor Gebrauch mit 15 ml Proteinpuffer äquilibriert und anschließend mit den Elutionsfraktionen beladen. Mit Hilfe dieser Säule wurde ein Pufferaustausch vorgenommen und das Imidazol aus der Proteinprobe entfernt. Die Proteinfraction wurde in drei Schritten à 500 µl von der PD-Säule mit Proteinpuffer eluiert. Die erhaltenden Eluate wurde mit Hilfe von Amicon Ultra Centrifugal Filters mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa (Merck Millipore, Darmstadt) auf ein maximales Volumen von 300 µl eingeeengt. Die gereinigten Proteinfractionen wurden kurzzeitig bei -20°C und für eine Langzeitlagerung bei -80°C aufbewahrt.

### Resuspensionspuffer

50 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 %	Tween 20
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### Waschpuffer I

50 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl
60 mM	Imidazol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 %	Tween 20
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### Waschpuffer II

50 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl
150 mM	Imidazol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 %	Tween 20
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### Waschpuffer III

50 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl
250 mM	Imidazol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 %	Tween 20
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### Elutionspuffer

50 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl
500 mM	Imidazol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05 %	Tween 20
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### Proteinpuffer

10 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
50 mM	NaCl
1 mM	DTT
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### 3.2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Das Bradford Assay ermöglicht durch die Verwendung des Farbstoffes Coomassie G-250 die Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Probe und wurde erstmals 1976 von Marion Bradford<sup>80</sup> beschrieben.

Für die Proteinbestimmung der gereinigten Proteine wurde das Micro Assay durchgeführt. 10 µl der Standardproteine, sowie der Probe wurde im gleichen Verhältnis mit Bradford Reagent (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) gemischt und sedimentiert. Die Messung der Reaktion erfolgte am NanoDrop-ND-1000UV/ Vis-Spektralphotometer (Peglab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) mit dem voreingestellten Programm „Protein Bradford“.

### 3.2.4.5 Zellernte und Aufschluss infizierte HELF Fi301-Zellen

Zur Gewinnung des Zellextrakts infizierter HELF Fi301-Zellen wurde nach einem bestimmten Zeitpunkt (wenn nicht anders gekennzeichnet, 96 h p.i.) eine Zellernte durchgeführt. Dazu wurde das Wachstumsmedium abgenommen die Zellen mit PBS (s. Seite 28) gespült und mit frischen PBS überschichtet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Kulturboden entfernt und für 7 min bei 100 x g und RT sedimentiert. Das Zellpellet wurde in RIPA-Puffer (versetzt mit 1:200 Protease-Inhibitor-Cocktail, EDTA-free; Abcam, Cambridge, Großbritannien) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte eine Sedimentation bei 15.300 x g und 4°C für 30 min.

#### RIPA-Puffer

50 mM	Tris/ HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
1 %	Triton X-100
0,5 %	Natrium-deoxycholat
0,1 %	SDS
	dH <sub>2</sub> O

### 3.2.4.6 Extraktion von Cytoplasma und Zellkern

Zur Trennung der Cytoplasma- und Zellkernfraktion wurden infizierte HELF Fi301-Zellen nach 96 h p.i. geerntet. Zunächst wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen mit PBS (s. Seite 28) gewaschen und überschichtet. Die Zellen wurden durch einen Zellschaber vom Kulturboden abgelöst und bei 20.8000 x g und 4°C für 7 min

## Proteinbiochemische Methoden

sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl CE Puffer aufgenommen und für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 4 min bei 20.800 x *g* und 4°C sedimentiert. Die cytoplasmatische Fraktion wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und das Zellkern-Sediment mit 100 µl CE Puffer ohne Detergenz (NP-40) vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation wurde die Zellkern-Fraktion in 50 µl NE Puffer gelöst. Nach Zugabe von 35 µl 5 M NaCl-Lösung und erneut 50 µl NE Puffer wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und periodisch durchmischt. Abschließend wurden die cytoplasmatische als auch die Zellkern-Fraktion bei 20.800 x *g* und 4°C für 10 min sedimentiert. Die Überstände wurden in saubere Eppendorf-Gefäße überführt und zu der cytoplasmatischen Fraktion wurden ca. 20 % Glycerol hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend mittels Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### CE-Puffer

10 mM	Hepes pH 7,4
60 mM	KCl
1 mM	EDTA
0,075 %	NP-40
1 mM	DTT
	dH <sub>2</sub> O

### NE-Puffer

20 mM	Tris/ HCl pH 8,0
420 mM	NaCl
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	EDTA
25 %	Glycerol
	dH <sub>2</sub> O

Die Puffer wurden mit 1:200 Protease-Inhibitor-Cocktail, *EDTA-free* (Abcam, Cambridge, Großbritannien) versetzt.

### **3.2.4.7 Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE) nach Schägger und von Jagow 1987<sup>81</sup>**

Die elektrophoretische Auftrennung der zu analysierenden Proteine erfolgte über eine Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE). Entsprechend des Molekulargewichtes von UL89 (75 kDa) wurden 10 %ige Trenngele verwendet. Ergänzend wurden 4 %ige Sammelgele gegossen. Vor Verwendung der Proben wurden diese mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit 1x-SDS-Laufpuffer bei einer kontinuierlichen Stromstärke zwischen 20 bis 30 mA durchgeführt. Beispielhaft sind die Gelkomponenten für ein SDS-Gel in Tabelle 20 aufgeführt.

## Proteinbiochemische Methoden

**Tabelle 20: Gelkomponenten für ein SDS-Gel.**

<b>Gelkomponente</b>	<b>10 % Trenngel [µl]</b>	<b>4 % Sammelgel [µl]</b>
Acrylamid-Lösung (Rotiporese Gel 30)	1667	267
4x-SDS-Trenngel-Puffer	1250	-
4x-Sammelgel-Puffer	-	500
dH <sub>2</sub> O	2083	1233
10% APS	60	50
TEMED	10	7,5

### Puffer für Tricin-SDS-PAGE

<b>4x-SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8)</b>		<b>4x-SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,8)</b>	
1,5 M	Tris/ HCl	0,5 M	Tris/ HCl
0,4 %	SDS	0,4 %	SDS
10 %	Glycerin		dH <sub>2</sub> O
	dH <sub>2</sub> O		
<b>10x-SDS-Laufpuffer</b>		<b>4x-SDS-Probenpuffer</b>	
1918 mM	Glycin	240 mM	Tris/ HCl (pH 6,8)
249 mM	Tris	277 mM	SDS
35 mM	SDS	40 %	Glycerin
	dH <sub>2</sub> O	0,01 %	Bromphenolblau
		50 mM	DTT
		ad 10 ml	dH <sub>2</sub> O

Zur weiteren Analyse wurde eine Coomassiefärbung bzw. Silberfärbung oder ein Western-Blot durchgeführt.

### **3.2.4.8 Coomassiefärbung eines SDS-Gels**

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurden die SDS-Gele zunächst mit Fixierlösung für 5 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mit der Färbelösung für 1 min in der Mikrowelle. Zur Entfernung der überschüssigen Färbelösung wurden die Gele für 1 min in der Mikrowelle mit 10 % Essigsäure inkubiert. Eine langsame Entfärbung fand dann in 10 % Essigsäure auf einer Wippe statt.

#### Fixierlösung

40 %	Isopropanol
10 %	Essigsäure
	dH <sub>2</sub> O

#### Färbelösung

10 %	Essigsäure
1 %	Coomassiebrilliantblau R-250
	dH <sub>2</sub> O

### 3.2.4.9 Silberfärbung eines SDS-Gels

Die Färbung der aufgetrennten Proteine im SDS-Gel erfolgte mit Hilfe einer Silberfärbung nach Swain und Ross<sup>82</sup>. Zunächst wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 10 min in 40 % Ethanol und 10 % Acetat fixiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift für 10 min in ddH<sub>2</sub>O. Es folgte ein Sensibilisierungsschritt für 5 min in 0,05 % Glutardialdehyd, 0,01 % Formalin und 40 % Ethanol. Das Gel wurde daraufhin für je 20 min in 40 % Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es schloss sich ein zweiter Sensibilisierungsschritt für 1 min in 0,2 g/l Natriumthiosulfat an. Anschließend wurde das Gel zweimal für 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 20 min in 0,1 % Silbernitrat angefärbt. Die Entwicklung erfolgte für ca. 15 min in 2,5 % Natrium-Carbonat, 0,04 % Formalin. Wobei die Lösung nach ca. 1 min erneuert wurde. Die Reaktion wurde durch Inkubation in 5 % Essigsäure gestoppt. Die Silberfärbung eines SDS-Gels hat gegenüber der Färbung mit Coomassiebrilliantblau R-250 (s. 3.2.4.8.) den Vorteil, dass die Sensitivität ungefähr einhundertfach höher liegt. Für die Färbung mit Coomassiebrilliantblau R-250 wird mindestens eine Proteinmenge von ca. 0,2 µg benötigt<sup>83</sup>.

### 3.2.4.10 Western Blot

Die elektrophoretische Übertragung der Proteine von dem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) erfolgte durch das Halbtrockenblot-Verfahren. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 0,84 mA/cm<sup>2</sup> Blotfläche für 1,5 h unter Verwendung des Western-Blot-Puffers. Anschließend an den Transfer erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation der Membran für 1 h schüttelnd in 5 %iger Magermilch bzw. BSA/ 0,1 % Tween 20/ 1x PBS-Lösung (s. Seite 28). Zur Entfernung der überschüssigen Blocking-Lösung wurden drei Waschschriffen mit 1x PBS/ 0,1 % Tween 20 für je 5 min durchgeführt. Es schloss sich die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf der Wippe an. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10 erfolgte die schwenkende Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Anschließend wurde der Blot sechsfach für 5 min mit 1x PBS/ Tween 20 gewaschen und die spezifischen Proteine durch Zugabe von *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) markiert. Durch die Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, wird das Substrat Luminol unter Freisetzung eines Chemilumineszenz-Signals umgesetzt. Dieses

## Proteinbiochemische Methoden

ECL-Signal (*enhanced chemiluminescence*) wurde mittels der CCD-Kamera Fusion SL (Vilber Lourmat, Eberhardzell) detektiert und dokumentiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

### Western Blot-Puffer

200 mM	Glycin
25 mM	Tris
20 %	Ethanol
	dH <sub>2</sub> O.

### **3.2.4.11 Kolorimetrische Bestimmung der dsDNA-Bindungsfähigkeit (modifiziert nach Banasik und Sachadyn, 2016<sup>84</sup>)**

Zur Bestimmung der dsDNA-Bindungsfähigkeit der rekombinanten Proteine wurde eine kolorimetrische Bestimmung der dsDNA-Bindungsfähigkeit durchgeführt. Dieser Versuch basiert auf zwei starke Interaktionen. Der Bindung His<sub>6</sub>-gekoppelter Proteine an eine Nickel-beschichtete 96 *well*-Mikrotiterplatte und die Bindung eines Avidin-Primärantikörper an Biotin-gekoppelte dsDNA.

Zunächst wurden die Vertiefungen fünf-Mal mit 200 µl Waschpuffer (WP) gewaschen, mit 2,5 µg gereinigtes pUL89 oder den Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub) beladen und für 15 min bei RT inkubiert. Es erfolgte bei der Hälfte der Versuchsansätze eine 10-minütige Vorinkubation mit 20 nmol Competitor-DNA (100x Überschuss zur Biotin-gekoppelten DNA, gleiche Sequenz, ohne Biotin), nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Beladung mit 200 pmol Biotin-250 bp-DNA und einer Inkubation von 10 min. Die Vertiefungen wurden anschließend erneut fünf-Mal mit WP gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper Extravidin-HRP (1:1000 in WP) für 10 min. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde abschließend in einem *Sunrise absorption reader* (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 620 nm ausgelesen.

### Waschpuffer

1x	PBS
1 %	Tween 20
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	dH <sub>2</sub> O



## Proteinbiochemische Methoden

Die Biotin-markierte DNA Probe als auch der Competitor-DNA wurden durch PCR hergestellt, dabei diente pUC-aseq als Template für die Reaktion. Folgende Oligonukleotide (s. Tabelle 21) wurden verwendet.

**Tabelle 21: Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotide in der Kolorimetrischen Untersuchung.**

Oligonukleotide	Sequenz [5' → 3']
Biotin-250-puc-3	Biotin-CGTGCACACAGCCCAGC
250-puc-3	CGTGCACACAGCCCAGC
pUC18_pac-5	ATTTCACCCCCCGCTAAAACTCCGCCCCCCTGACGAG

In den folgenden Tabellen 22 und 23 sind die Bedingungen und PCR-Ansätze zusammengefasst die für die Herstellung der DNA-Proben verwendet wurden.

**Tabelle 22: Zusammenfassung des PCR-Ansatzes.**

Komponente	Volumen [µl]
5x-GC-Phusion-Polymerase-Puffer	10
10 mM dNTP-Mix	4
Template (592,3 ng/ µl)	1
10 µM Primer 1	1
10 µM Primer 2	1
2 U/ µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5
ad ddH <sub>2</sub> O	50

**Tabelle 23: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenanzahl
einleitende Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Hybridisierung	67,1	30 s	30
Extension	72	45 s	
Final Extension	72	4 min	1
Kühlung	8	unbegrenzt	1

### 3.2.4.12 Nuklease-Experiment (modifiziert nach Bogner et al. 1998<sup>50</sup>)

Zur Charakterisierung des Nuklease-Motivs wurden die rekombinanten Proteine mit den Punktmutationen in den postulierten Aminosäure-Resten in Nuklease-Untersuchungen eingesetzt. Pro Ansatz wurden 600 ng Plasmid pUC-aseq verwendet. Dieses Plasmid kodiert für die *a*-Sequenz, welche die Verpackungsmotive *pac1* und *pac2* enthält, und besitzt eine einzelne Restriktionsschnittstelle für das Enzym *HindIII* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte).

## Proteinbiochemische Methoden

Als Negativkontrolle wurde das kovalent-geschlossene, zirkuläre Plasmid (cccDNA) pUC-aseq in 10 µl Proteinpuffer eingesetzt. Die Positivkontrolle zeigt die Reaktion mit *HindIII* und dass daraus resultierende lineare Plasmid.

Der pUL89-Wildtyp wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 5 µM) getestet. Anschließend wurde eine Konzentration von 0,5 µM für die Testung von pUL89-sub festgelegt. Ergänzend wurde die Inhibierung der Nuklease-Aktivität der Proteine durch die Zugabe des Terminase-Inhibitors BDCRB getestet (Leory B. Townsend, University of Michigan). Des Weiteren wurden die Fähigkeit von pUL89 lineare DNA zu schneiden untersucht.

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert mit Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ ml) versetzt und für 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x-DNA-Ladepuffer beendet und eine elektrophoretische Auftrennung auf einem 0,8 %igen Agarosegel bei 120 V für 120 min durchgeführt.

### Proteinpuffer

10 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
50 mM	NaCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
0,1 mM	PMSF
	dH <sub>2</sub> O

### **3.2.4.13 Pull-down Versuch mit Kernextrakten von infizierten HELF Fi301-Zellen**

Pro Ansatz wurden 100 µl Pierce™ Streptavidin Agarose Resin (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) mit 1000 µl *Pull-down*-Puffer (PDP) für 2 h bei RT und 50 U/ min im Inkubationsrad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Sedimentierung der Agarose bei 20.800 x g für 5 min. Die Agarose wurde in 500 µl PDP aufgenommen und mit 500 ng Biotin-250 bp-DNA (s. 3.2.4.11.) für 30 min bei RT und 50 U/ min beladen. Nach erneuter Sedimentierung wurde die Agarose zweimal mit 100 µl PDP gewaschen und in 500 µl PDP gelöst. Der Ansatz wurde mit 10 µg Kernextrakt von, mit TB40/E oder den Histidin-Virusmutanten, infizierten HELF Fi301 über Nacht bei 50 U/ min und 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Sedimentierung der Agarose bei 20.800 x g, 4°C und 5 min. Die Pierce™ Streptavidin Agarose wurde dreimal mit 100 µl PDP gewaschen um schwach gebundene Proteine zu entfernen. Abschließend wurde die Agarose mit

## Proteinbiochemische Methoden

15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und mit den Proben des Inputs, Durchlaufs und Waschfraktionen für 5 min bei 95°C inkubiert. Zur Auswertung der DNA-Bindungseigenschaften wurde eine Analyse mit Hilfe einer SDS-PAGE (s. Seite 55-56) und eines Western Blots (s. Seite 57-58) durchgeführt. Abschließend wurde eine Quantifizierung mit dem Programm *CLIQS* (Totallab, Newcastle upon Tyne; Großbritannien) durchgeführt. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

### Pull-down-Puffer (PDP)

10 mM	Tris/ HCl (pH 7,4)
50 mM	NaCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
1 mM	EDTA
	dH <sub>2</sub> O
1:200	Protease-Inhibitor Cocktail, EDTA-free (Abcam, Cambridge, Großbritannien)

### 3.2.5 Elektronenmikroskopie

#### 3.2.5.1 Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie

Infizierte HELF Fi301-Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wurden nach 96 h p.i. (MOI = 3) in 4 ml 20 mM HEPES pH 7,4 mit 2,5 % Glutardialdehyd geerntet und für 90 min bei 50 U/ min fixiert. Nach 3-maligen Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (2.500 x g, 5 min), einer Nachfixierung mit 1 % Osmiumtetroxid in ddH<sub>2</sub>O für 1 h bei 50 U/ min, wurden die Zellen für 1h bei 50 U/ min mit 0,1 % Tannin in 20 mM HEPES pH 7,4 kontrastiert. Gefolgt von Dehydrierungsschritten für 2 x 10 min in 1 % Natriumsulfat in 20 mM HEPES (pH 7,4) und 2 x 5 min in 50 % Ethanol bei 50 U/ min. Die Zellen wurden für 30 min und 50 U/ min in 0,2 % Uranylacetat in 70 % Ethanol gefärbt. Es folgten weitere Dehydrierungsschritte in 90 % und 100 % Ethanol für je 3 x 10 min, sowie 2 x 20 min in 100 % Propylenoxid bei 50 U/ min. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 1 h in 33 % und 66 % Epon in Propylenoxid bei 50 U/ min inkubiert, um abschließend in Beem-Kapseln® mit 100 % Epon eingebettet zu werden. Zur Polymerisation wurden die eingebetteten Zellen für 72 h bei 60°C inkubiert.

Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mittels Ultramikrotom. Die Schnitte wurden auf Kupfer-Netzchen mit Schlitzblenden (Plano GmbH, Wetzlar), welche mit Pioloform beschichtet sind, übertragen und für 10 min mit 1 % Uranylacetat in 40 % Ethanol sowie für 10 min mit Bleicitrat angefärbt.

Die Analyse erfolgte mit einem FEI Elektronenmikroskop Tecnai G2 bei einer konstanten Spannung von 120 kV. Die Vergrößerung wurde mit einem Kreuzgitter-Replika (2.160 Linien/ mm) kalibriert.

#### Epon für Elektronenmikroskopie

##### Lösung A:

20 ml Glycidether 100 (Epon)  
32 ml Härter DBA

##### Lösung B:

32 ml Glycidether 100 (Epon)  
28 ml Härter MNA

## **Elektronenmikroskopie**

Lösung A und Lösung B wurden jeweils 15 min gerührt, vereint und erneut 15 min gerührt. Nach Zugabe von 1,5 % des Beschleuniger BDMA wurde die Lösung erneut für 15 min gerührt. Das Epon wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 *In silico* Analyse der HCMV Nuklease pUL89

Zur Durchführung einer *in silico* Analyse der Nuklease pUL89 wurden die Programme *DP-Bind*<sup>85</sup>, *ZF Tools Version 3*<sup>86</sup>, *GYM 2.0*<sup>87</sup>, *Helix-Turn-Helix Motif Prediction*<sup>88</sup> und *PSIPRED*<sup>89</sup> verwendet. *DP-Bind* diente zur Identifizierung essenzieller Aminosäuren (AA) innerhalb pUL89, welche eine entscheidende Rolle bei der dsDNA-Bindung einnehmen. Die *in silico* Programme *ZF Tools Version 3*, *GYM 2.0* und *Helix-Turn-Helix Motif Prediction* wurden zu der Vorhersage von DNA-bindenden Domänen genutzt, während *PSIPRED* eine Vorhersage der potenziellen Sekundärstruktur ermöglichte. Des Weiteren wurde eine *in silico* Analyse des Proteins mit Hilfe des Strukturanalyse-Programmes *Phyre2 (intensive mode)*<sup>90</sup> durchgeführt. Zur Visualisierung der Tertiärstruktur und Analyse der Oberflächenladung wurde das Programm *UCSF Chimera*<sup>91</sup> verwendet. Abschließend wurde durch einen Sequenzvergleich mit homologen Proteinen aus verwandten Herpesviren und Bakteriophagen, konservierte Aminosäuren identifiziert. Für diesen Sequenzvergleich wurde das Programm *MEGA7*<sup>92</sup> verwendet.

##### 4.1.1 Identifizierung und Analyse potenziell DNA-bindender Aminosäuren mit Hilfe bioinformatischen Programme

Zur Identifizierung DNA-bindender Aminosäuren wurde zunächst eine Analyse mit *DP-Bind*<sup>85</sup> durchgeführt. Dieses Programm analysiert die Primärstruktur des Proteins und bewertet die einzelnen Aminosäuren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur DNA-Bindung. Als Eingabe-Sequenz wird eine Aminosäure-Sequenz im FASTA-Format verwendet. Durch das verwendete Programm werden die drei Vorhersagen *SVM*, *KLR* und *PLR* berechnet. Ergänzend werden ein Mehrheit-Konsens (*majority consensus*) sowie ein exakter Konsens (*strict consensus*) angegeben, die eine Aussage zur Bindungsfähigkeit der Aminosäuren ermöglichen. Der Mehrheits-Konsens wird für die Einzelsequenz-basierte Vorhersage verwendet, während der exakte Konsens zur Vorhersage einer hohen Konfidenz<sup>85</sup> dient. Die Bezeichnung „1“ steht für „DNA-Bindung“, während 0 „keine DNA-Bindung“ kennzeichnet. Tabelle 24 zeigt die ermittelten DNA-bindenden Aminosäuren der *DP-Bind*-Analyse von pUL89 (dritte Spalte). Die Aminosäuren wurden in DNA-bindende Regionen (DBR) zusammengefasst (erste Spalte). In der

## Ergebnisse

zweiten Spalte ist der Sequenzbereich dieser potenziell DNA-bindenden Regionen dargestellt

**Tabelle 24:** Zusammenfassung der identifizierten DNA-bindenden Regionen (DBR) in pUL89 durch das Programm *DP-Bind*.

DNA-bindende Region (DBR)	Sequenzbereich (AA)	Aminosäuren
1	40-44	R40, K41, R42, Q44
2	206-220	K206, A207, T208, P213, R214, R215, H216, G217, K218, T219, W220
3	242-246	A242, H243, Q244, K245, H246
4	294-302	N294, N296, S297, R299, G300, N302
5	463-474	D463, A465, F466, T467, T468, N469, R471, K471, A472, S473, G474
6	535-546	G535, N536, T537, R544, I545, A546
7	580-600	G580, R581, K583, A586, R593, N595, S596, G597, Y598, K600
8	638-646	A638, Y640, S641, A642, K643, R644, Q645, N646
9	661-672	Y661, H667, R670, R672

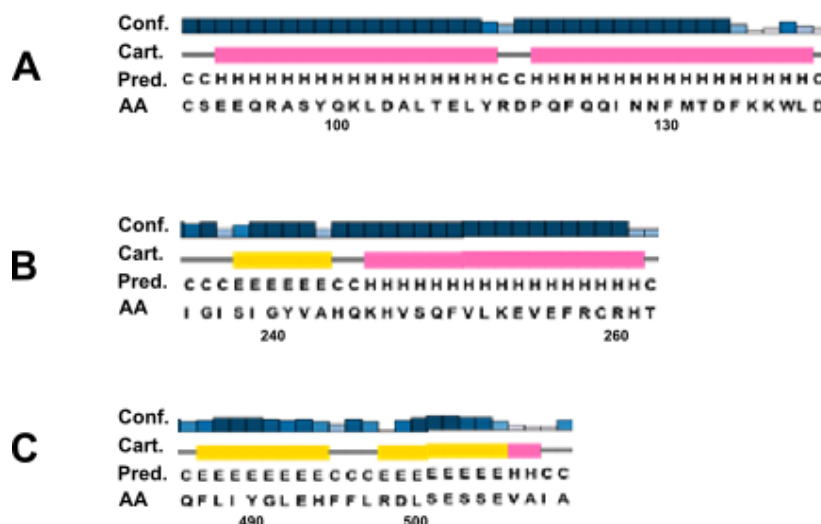
Mit Hilfe der Analyse durch *DP-Bind* konnten neun potenziell DNA-bindende Regionen (DBR 1-9) identifiziert werden. Die dargestellten Aminosäuren weisen, basierend auf der Analyse, eine Fähigkeit zur DNA-Bindung mit einer Wahrscheinlichkeit von „1“ auf. Die DNA-Bindung von Proteinen wird durch bestimmte Domänen, funktional und strukturell unabhängige Abschnitte des Proteins, vermittelt. Dazu zählen Zink-Finger-Domänen<sup>93</sup> und *Helix-Turn-Helix*-Motive (HTH-Motive) bzw. *Helix-Hairpin-Helix*- und *Helix-Loop-Helix*-Motive<sup>94</sup>. Zur Eingrenzung der DBR 1-9 wurden die ermittelten Regionen hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einer dieser Domänen-Typen untersucht. Die Analyse auf Zink-Finger-Domänen erfolgte durch die Verwendung des Programms *ZF Tools Version 3*<sup>86</sup>. Es konnten durch *ZF Tools Version 3* keine Zink-Finger-Domänen identifiziert werden

Zur Detektion von HTH-Motiven wurden die Programme *GYM 2.0*<sup>87</sup> und *Helix-Turn-Helix Motif Prediction*<sup>88</sup> verwendet. Beide Programme konnten keine signifikanten HTH-Motive identifizieren. Jedoch wurden durch *GYM 2.0* zwei mögliche HTH-Motive, mit einer geringen Wahrscheinlichkeit, festgestellt. Das erste liegt im Bereich der Aminosäuren 103 bis 138 (HTH-1), während das zweite im Bereich 487 bis 507 (HTH-2) lokalisiert ist. Ebenso konnte durch die Analyse mit *Helix-Turn-Helix Motif Prediction* ein weiteres nicht-signifikantes, potenzielles HTH-Motiv zwischen den Aminosäuren 236 bis 261 (HTH-3) identifiziert werden.

## Ergebnisse

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde eine Sekundärstruktur-Analyse mit Hilfe von *PSIPRED*<sup>89</sup> durchgeführt. Unter Verwendung dieses Programms, welches drei verschiedene Methoden zur Analyse anwendet, kann die Sekundärstruktur einer Aminosäuresequenz modelliert werden. *PSIPRED* benutzt die Methoden *PSIPRED*<sup>95</sup>, *GenTHREADER*<sup>96</sup> und *MEMSAT 2*<sup>97</sup>. Während *PSIPRED* namensgebend ist und eine verlässliche Sekundärstruktur modelliert, erkennt *GenTHREADER* schnell und verlässlich die Faltung eines Proteins. *MEMSAT 2* hingegen analysiert die Struktur und Topologie von Transmembranproteinen.

Für das potenzielle HTH-1 konnte durch *PSIPRED* eine Sekundärstruktur bestehend aus *Helix-Turn-Helix* vorhergesagt werden (s. Abb. 11A), jedoch konnte diese Struktur für das HTH-2 und HTH-3 nicht bestätigt werden. Der Analyse von *PSIPRED* zu Folge besteht die Sekundärstruktur in diesen Bereichen aus  $\beta$ -Faltblätter (HTH-2) bzw. einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt (s. Abb. 11B/ C).



**Abbildung 11: Identifizierte potenzielle HTH-Motive in pUL89. (A)** HTH-Motiv im Bereich der Aminosäuren 103-138 identifiziert durch *GYM 2.0*. **(B)** HTH-Motiv im Bereich der Aminosäuren 236-261 identifiziert durch *Helix-Turn-Helix Motif Prediction*. **(C)** HTH-Motiv im Bereich der Aminosäuren 487-507 identifiziert durch *GYM 2.0*. Conf. ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage. Je dunkler die Blaufärbung, desto wahrscheinlicher ist die Korrektheit der Vorhersage. Cart. zeigt eine grafische Darstellung der vorhergesagten Sekundärstruktur, während Pred. den Code für die Vorhersage angibt. Der pinke Balken steht für eine  $\alpha$ -Helix-Konformation (H). Der gelbe Balken steht für eine  $\beta$ -Faltblatt-Konformation (E), während der graue Strich eine Coil-Konformation (C) darstellt. AA zeigt die Aminosäuresequenz.

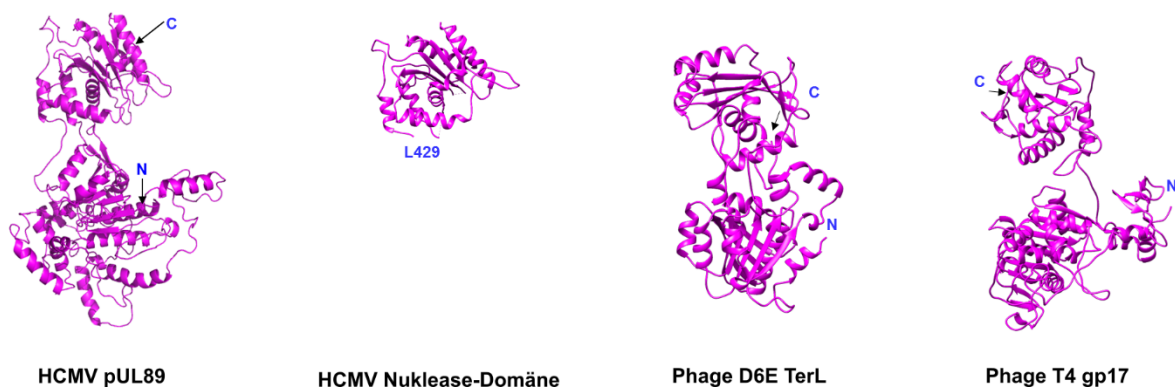
Ein Vergleich der Ergebnisse von *DP-Bind*, *GYM 2.0* und *PSIPRED* zeigte jedoch, dass eine bioinformatische Vorhersage zu funktionellen Aminosäuren nicht eindeutig möglich war. In dem einzigen bestätigten HTH-Motiv (AA 103-138) konnten durch *DP-Bind* keine Aminosäuren mit einer DNA-Bindungsfähigkeit identifiziert werden.



## Ergebnisse

### 4.1.2 Strukturelle Analyse mit *Phyre2*

Anschließend wurde eine strukturelle Analyse der Nuklease pUL89 durchgeführt, um eine weitere Eingrenzung der potenziell funktionellen Domänen zu ermöglichen. Zur Vorhersage der Tertiärstruktur der Nuklease pUL89 wurde das Programm *Phyre2*<sup>90</sup> (*intensive mode*) verwendet. Dieses Programm ermöglichte basierend auf homologen Proteinen eine Modellierung der Tertiärstruktur. Zur Analyse des Gesamtproteins pUL89 wurden über 100 homologe Strukturen verwendet. Das Ergebnis zeigt ein Proteinmodell mit einer N-terminalen und C-terminalen Domäne. Beide sind über eine flexible Region, welche als *hinge*-Region bezeichnet wird, miteinander verbunden<sup>98</sup>.



**Abbildung 12: Vergleich der vorhergesagten Struktur von pUL89 mit homologen Proteinen.** Das Ribbon-Modell des Gesamtproteins pUL89 wurde mit der Nuklease-Domäne<sup>68</sup> (HCMV Nuklease-Domäne, PDB: 3N4P), mit der TerL des thermophilen Tiefsee-Phagen D6E (Phage D6E TerL, PDB: 5OE9\_C) und gp17 des Bakteriophagen T4 (Phage T4 gp17, PDB: 3EZK\_B) verglichen (modifiziert nach Theiß et al.2019<sup>98</sup>)

In Abbildung 12 ist die modellierte Struktur des Gesamtproteins pUL89 dargestellt. Als Vergleich wurden die Kristallstrukturen der homologen Proteine gp17 des Bakteriophagen T4 (PDB: 3EZK\_B) und TerL des thermophilen Tiefsee-Phagen D6E (PDB: 5OE9\_C), sowie die Nuklease-Domäne<sup>68</sup> von pUL89 (PDB: 3N4P) abgebildet. Der Strukturvergleich durch *Phyre2* zeigte, dass diese drei Proteine eine 100 %ige (gp17 und Nuklease-Domäne von pUL89) bzw. eine 99,2 %ige (TerL von D6E) Übereinstimmung mit dem Gesamtprotein pUL89 aufweisen. Der C-Terminus von pUL89 weist die charakteristische Faltung der *RNase H-Like* Superfamilie<sup>68</sup> auf. Diese Familie beinhaltet Enzyme die RNA in DNA: RNA-Hybride abbauen. Diese konservierte Faltung wurde bereits in der HCMV Nuklease-Domäne identifiziert und charakterisiert<sup>68</sup>.

## Ergebnisse

### 4.1.3 Konstruktion der Proteinaustausch-Mutanten von pUL89

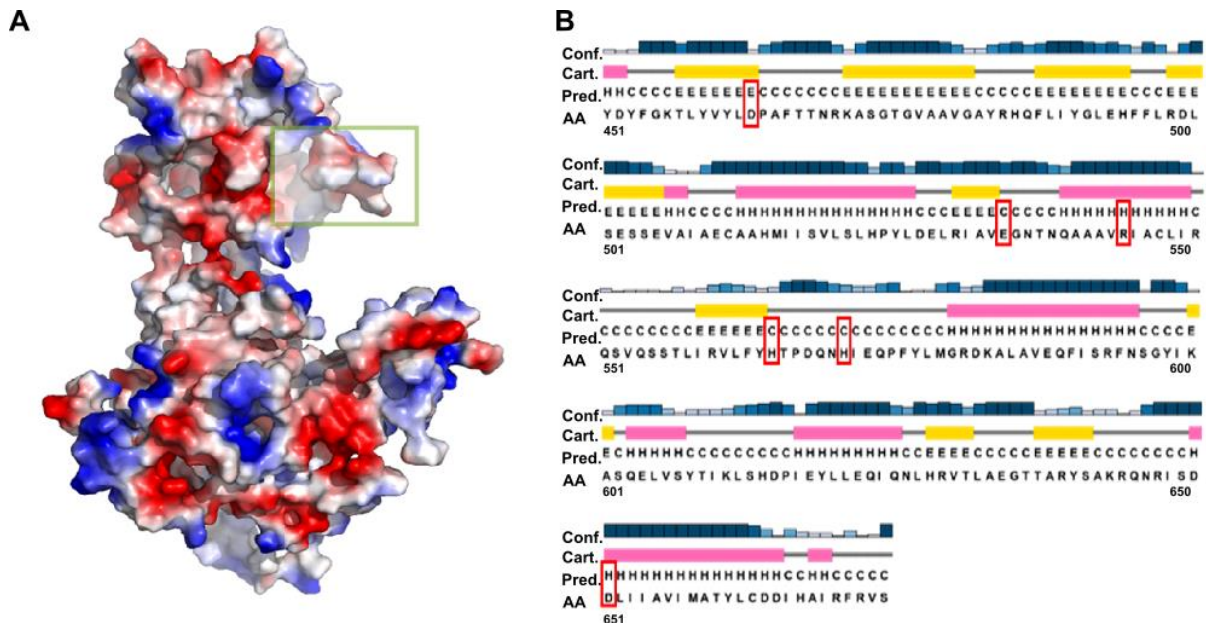
In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass pUL89 eine DNA-Bindungsfähigkeit<sup>62</sup> und eine Nuklease-Aktivität<sup>55</sup> aufweist. Zur Auswahl der Proteinaustausch-Mutanten innerhalb funktioneller Domänen dieses Proteins wurde zunächst eine Analyse der Oberflächenladung mit *UCSF Chimera*<sup>91</sup> durchgeführt (s. Abb.13A). Die Proteinaustausch-Mutanten wurden anhand der elektrostatischen Oberflächenladung des Proteins<sup>98</sup>, sowie der charakteristischen Faltung des C-Terminus ausgewählt. In einer Studie von Nadal et al.<sup>68</sup> konnten in diesem C-terminalen Konstrukt von pUL89 (AA 418-674, HCMV Nuklease-Domäne, s. Abb. 12) die drei essenziellen Aminosäuren D463, E534 und D651 identifiziert werden. Der Austausch einer dieser Aminosäuren führte zu einer signifikanten Verringerung der Nuklease-Aktivität dieses Konstruktes. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte getestet werden, ob diese Aminosäuren auch eine essenzielle Funktion im Gesamtprotein aufweisen. Die potenziell DNA-bindenden Aminosäuren wurden anhand ihrer strukturellen Nähe zu den Nuklease-Aminosäuren ausgewählt. Der Bereich im Protein, in dem die ausgewählten potenziellen DNA-bindenden Aminosäuren lokalisiert sind, weist eine positive Nettladung auf (rote Färbung, s Abb. 13A, grüne Markierung). Die ausgewählten Proteinaustausch-Mutanten sind in Tabelle 25 zusammengefasst<sup>98</sup>.

**Tabelle 25: Potenziell-funktionelle Aminosäuren von pUL89.** Die zusammengefassten Aminosäuren wurden für die ortsgerichtete Mutagenese ausgewählt und es wurden Proteinaustausch-Mutanten erstellt.

DNA-bindende Aminosäuren	Nuklease-Aminosäuren basierend auf Nadal et al. <sup>68</sup>
R544	D463
H565	E534
H571	D651

Die Aminosäure R544 befindet sich dabei innerhalb der DBR 6, zu der die Aminosäure E534 benachbart vorliegt. Während D463 in der DBR 5 liegt, sind die restlichen Aminosäuren außerhalb dieser Regionen lokalisiert. Abschließend wurde die Sekundärstruktur im Bereich der ausgewählten Proteinaustausch-Mutanten mit Hilfe von *PSIPRED*<sup>89</sup> analysiert. Die vorhergesagte Sekundärstruktur ist in Abbildung 13B dargestellt. Die Aminosäuren D463 und E534 befinden sich innerhalb eines der  $\beta$ -Faltblätter der RNase H Faltung. Während R544 und D651 in den umgebenden  $\alpha$ -Helices lokalisiert sind. Die Histidin-Aminosäuren H565 und H571 hingegen liegen in einer flexiblen *Coil*-Region.

## Ergebnisse



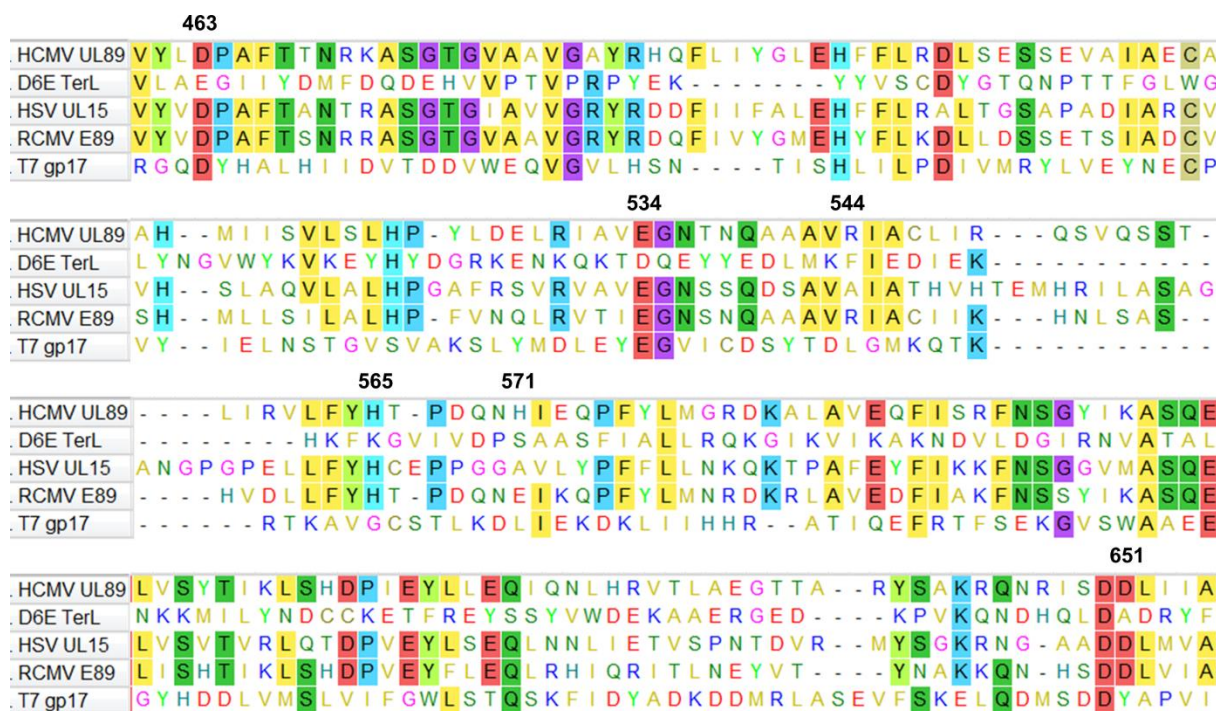
**Abbildung 13: Analyse der pUL89-Sekundärstruktur mit PSIPRED.** (A) Verteilung der Oberflächenladung des Proteins pUL89. Eine positive Ladung (+ rot), eine negative Ladung (- blau) und eine neutrale Ladung (+/- weiß) sind dargestellt. Die grüne Markierung kennzeichnet den Bereich der ausgewählten Alanin-Austauschmutanten. Die Analyse wurde mit USCf Chimera<sup>91</sup> durchgeführt. (B) Dargestellt ist die Analyse der Aminosäuren 451 bis 674. Conf. (Wahrscheinlichkeit der Vorhersage), Cart. (grafische Darstellung der vorhergesagten Sekundärstruktur), Pred. (Code für die Vorhersage, pink ( $\alpha$ -Helix, H); gelb ( $\beta$ -Faltblatt, E); grau (Coil, C) AA (Aminosäuresequenz) (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

### 4.1.4 Sequenzvergleich mit MEGA7

Zur Überprüfung der Konservierung der ausgewählten Aminosäurereste wurde ein Sequenzvergleich mit homologen Proteinen aus verwandten Herpesviren und dsDNA-Bakteriophagen durchgeführt. Die Sequenz von HCMV pUL89 wurde mit den homologen Terminase-Untereinheiten in HSV-1 (pUL15), sowie des Ratten-Cytomegalievirus (RCMV, E89) verglichen. Außerdem wurden die homologen Proteine TerL (Bakteriophage D6E) und gp17 (T7 Bakteriophage) in den Sequenzvergleich miteinbezogen. Abbildung 14 zeigt den Sequenzvergleich der homologen Proteine.

Die Aminosäuren D463, E534, H565 und D651 liegen konserviert innerhalb der ausgewählten homologen Proteine vor. Des Weiteren zeigt der Sequenzvergleich, dass die Aminosäure 544 funktionell konserviert ist. In den drei homologen Proteinen pUL89 (HCMV), E89 (RCMV) und gp17 (T7-Bakteriophage) konnte eine basische Aminosäure an dieser Stelle identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ist die Position 571 innerhalb der fünf homologen Proteine nicht konserviert.

## Ergebnisse

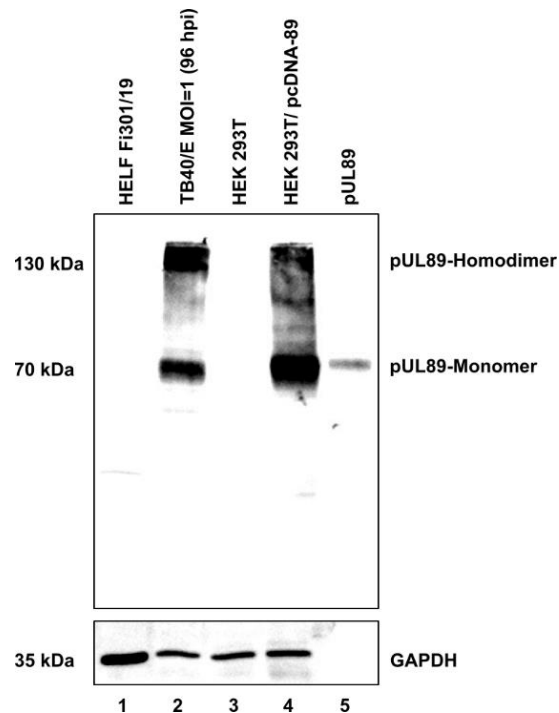


**Abbildung 14: Sequenzvergleich von HCMV pUL89 mit homologen Proteinen.** Für den Sequenzvergleich wurden die zu pUL89 (HCMV) homologen Protein pUL15 (HSV-1), E89 (RCMV), sowie die Bakteriophagen-Proteine gp17 (T7) und TerL (D6E) in die Analyse miteinbezogen. Konservierte Aminosäuren sind farblich unterlegt.

### 4.2 Validierung des Maus-Antikörpers gegen das HCMV Terminase-Protein pUL89 ( $\alpha$ -pUL89)

Zur Analyse der Spezifität des Maus-Antikörpers  $\alpha$ -pUL89 wurde eine SDS-Tricin-PAGE (s. Seite 55-56) mit Extrakten von verschiedenen Zelllinien durchgeführt und anschließend mittels Western Blot (s. Seite 57-58) analysiert. Bei dem vorliegenden Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen die HCMV Terminase-Untereinheit pUL89, welcher von Prof. Dr. Stipan Jonjic (Med. Fakultät, Universität von Rijeka, Kroatien) zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden jeweils 15  $\mu$ g Zellextrakt bzw. 5  $\mu$ g des gereinigten pUL89 (s. Seite 52-53) aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen aufgetragen. Abbildung 15 zeigt die Western-Blot Analyse des monoklonalen Antikörpers  $\alpha$ -pUL89.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: Darstellung der Validierung von  $\alpha$ -pUL89.** Nach Auftrennung durch eine SDS-Tricin-PAGE erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers wurden 15  $\mu$ g verschiedener Zellextrakte aufgetragen. In der ersten Spur wurde ein Zellextrakt von nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen aufgetragen. In Spur zwei wurde Zellextrakt von mit TB40/E infizierten HELF Fi301 (MOI = 1) aufgetragen. Spur drei zeigt den Zellextrakt von HEK-293T-Zellen. In der vierten Spur wurde Zellextrakt von mit pcDNA-89 transient transfizierten HEK-293T-Zellen aufgetragen. Spur fünf zeigt 5  $\mu$ g des gereinigten pUL89 aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen. Als Ladungskontrolle wurde  $\alpha$ -GAPDH verwendet (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

Die erste Spur zeigt den Zellextrakt von nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen, in dem keine Antikörperbindung durch  $\alpha$ -pUL89 detektiert werden konnte. In Spur zwei wurde der Extrakt von TB40/E-infizierten HELF Fi301-Zellen mit einer *Multiplicity of Infection* von 1 (MOI = 1) aufgetragen. Die Ernte der Zellen erfolgte 96 h nach Infektion (96 h p.i., *hours post infection*) und es wurde eine Proteinextraktion mit Hilfe eines RIPA-Puffers durchgeführt. (s. Seite 54). Der Antikörper detektiert zwei abundante Banden bei 70 und 130 kDa, die den Molekulargewichten des Monomers und Homodimers von pUL89 entsprechen. In Spur drei wurde der Zellextrakt von HEK-293T-Zellen aufgetragen. Wie bei den nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen findet keine Bindung durch den Antikörper statt. In der vierten Spur wurde der Extrakt von transient transfizierten HEK-293T-Zellen aufgetragen. Die Transfektion mit dem Expressionsvektor pcDNA-89 erfolgte für 48 h (s. Seite 46). Anschließend wurden die

## Ergebnisse

Zellen geerntet, sedimentiert und in RIPA-Puffer gelöst. Der Antikörper bindet wie bereits bei den infizierten HELF Fi301 an zwei Proteinfractionen bei 70 und 130 kDa. In Spur fünf wurden 5 µg des aufgereinigten Proteins pUL89 aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen aufgetragen. Der Antikörper zeigt eine distinkte Bande bei 70 kDa. Als Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen GAPDH verwendet. Dieser bindet in den Spuren 1 bis 4 an eine Fraktion bei 35 kDa, dem Molekulargewicht von GAPDH<sup>98</sup>.

### 4.3 *In vitro* Charakterisierung funktioneller Domänen der Terminase-Untereinheit pUL89

Zur Charakterisierung der ausgewählten Alanin-Austauschmutanten wurden diese zunächst mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) generiert sowie durch Sanger-Sequenzierung<sup>78</sup> (LGC Genomics GmbH, Berlin) verifiziert. Anschließend erfolgte eine transiente Expression, sowie eine Aufreinigung des rekombinanten pUL89 bzw. der Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub). Diese gereinigten Proteine wurden anschließend für *in vitro* Proteinuntersuchungen eingesetzt. Durch Nuklease-Untersuchungen sollte die Funktionalität dieser enzymatischen Aktivität im Wildtyp-Protein näher charakterisiert, sowie der Einfluss der eingefügten Mutationen untersucht werden. Des Weiteren wurde die Fähigkeit dsDNA *in vitro* zu binden durch kolorimetrische DNA-Bindungsuntersuchungen analysiert.

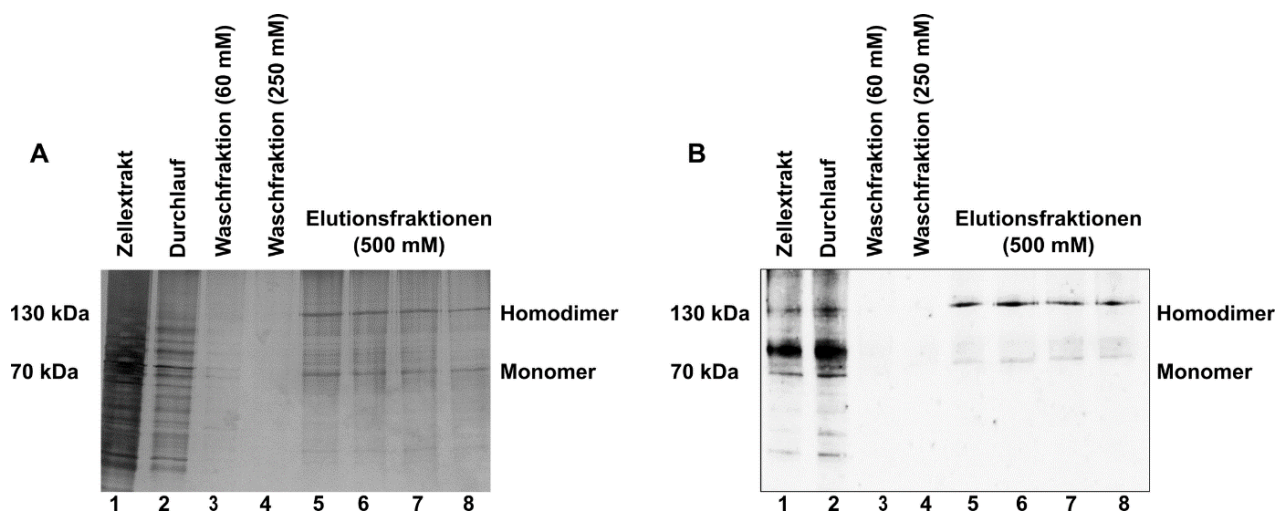
#### 4.3.1 Native Reinigung von pUL89 und pUL89-sub aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine pUL89 bzw. pUL89-sub erfolgte aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen (s. Seite 52-53). Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet, sedimentiert und in Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend erfolgten der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung und die erneute Sedimentation zur Trennung von Zellextrakt und festen Zellbestandteilen. Zur Isolierung der rekombinanten Proteine (pUL89 oder pUL89-sub) erfolgte eine Inkubation des verdünnten Zellextrakts (1 mg/ ml) für eine Stunde mit magnetischen Kügelchen (*His Mag Sepharose Ni Magnetic Beads*, GE Healthcare, München) bei 4°C und 5 U/ min. Durch den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA-3.1/ His<sup>®</sup> B werden die rekombinanten Proteine mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen, sodass eine



## Ergebnisse

Reinigung durch die Methode der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht wurde. Die anschließenden Waschschrte dienten zur Entfernung schwachgebundene Proteine von den magnetischen Kügelchen, während das über den His<sub>6</sub>-Tag gebundene rekombinante Protein fest an den Kügelchen gebunden blieb. Durch einen Überschuss an Imidazol konnte das gebundene Protein von den Kügelchen eluiert werden. Zur Entfernung des Imidazols wurde ein zweiter Reinigungsschritt mit einer PD-midiTrap G-25-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Konzentrierung der Proteine und eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Bradford-Assay<sup>80</sup> (s. Seite 54).



**Abbildung 16: Analyse der nativen Reinigung von pUL89 aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen.** Die einzelnen Zwischenschritte der Aufreinigung wurden mit Hilfe einer SDS-Tricin-PAGE aufgetrennt und anschließend analysiert. **(A)** Silberfärbung und **(B)** Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -pUL89. Die erste Spur zeigt den Zellextrakt. In der zweiten Spur ist der Durchlauf dargestellt. Die Spuren drei und vier zeigen die Waschraktionen. In den Spuren fünf bis acht sind die Elutionsfraktionen abgebildet (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Reinigung von pUL89 oder pUL89-sub wurden die einzelnen Zwischenschritte mit Hilfe einer SDS-Tricin-PAGE (s. Seite 55-56) aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung (s. Seite 57) und Western Blot (s. Seite 57-58) analysiert. Abbildung 16 zeigt die Überprüfung der nativen Reinigung mit einer Silberfärbung (A) bzw. einem Western Blot (B) mit dem monoklonalen Maus-Antikörper  $\alpha$ -pUL89.

Im Zellextrakt und Durchlauf (Spuren eins und zwei) sind eine Vielzahl zellulärer Proteine mit unterschiedlichen Molekulargrößen in der Silberfärbung ersichtlich. Auf Grund der Anzahl der aufgetrennten Proteine in diesen beiden Spuren ist es, vor allem im Zellextrakt, unmöglich distinkte Banden zu identifizieren. Im Gegensatz dazu ist es

## Ergebnisse

im Western Blot bereits möglich, einzelne Banden nachzuweisen. Eine besonders abundante Proteinbande befindet sich bei ca. 70 kDa und entspricht dem Monomer von pUL89. In den Waschfraktionen (Spuren drei und vier) sind bei der Silberfärbung einzelne Proteinbanden erkennbar, welche durch das Imidazol von den magnetischen Kügelchen entfernt wurden. Diese Banden treten im Western Blot nicht auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass durch die Waschpuffer kein gebundenes pUL89 abgelöst wurde. In den Elutionsfraktionen (Spuren fünf bis acht) sind zwei abundante Proteinbanden bei ca. 70 und 130 kDa sowohl in der Silberfärbung als auch im Western Blot nachweisbar. Diese entsprechen den Molekulargewichten des Monomers bzw. des Homodimers von pUL89<sup>98</sup>.

Die Molarität der gereinigten Proteinfraction wurde mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$c = \frac{m}{M \cdot V}, \quad \text{mit } M = 77,034 \frac{g}{mol}$$

### 4.3.2 Charakterisierung der Nuklease-Aktivität von pUL89 und pUL89-sub

Zur Charakterisierung der Nuklease-Aktivität von pUL89 wurden *in vitro* Nuklease-Untersuchungen mit dem gereinigten Wildtyp-Protein pUL89 bzw. den Proteinaustausch-Mutanten pUL89-sub durchgeführt. Die durchgeführten Versuche und ausgewählten Aminosäuren beruhen auf Erkenntnissen aus der Publikation Nadal et al., 2010<sup>68</sup>. In dieser Arbeit wurde die C-terminale Domäne (AA 418-674) der Terminase-Untereinheit pUL89 bezüglich einer Nuklease-Aktivität untersucht.

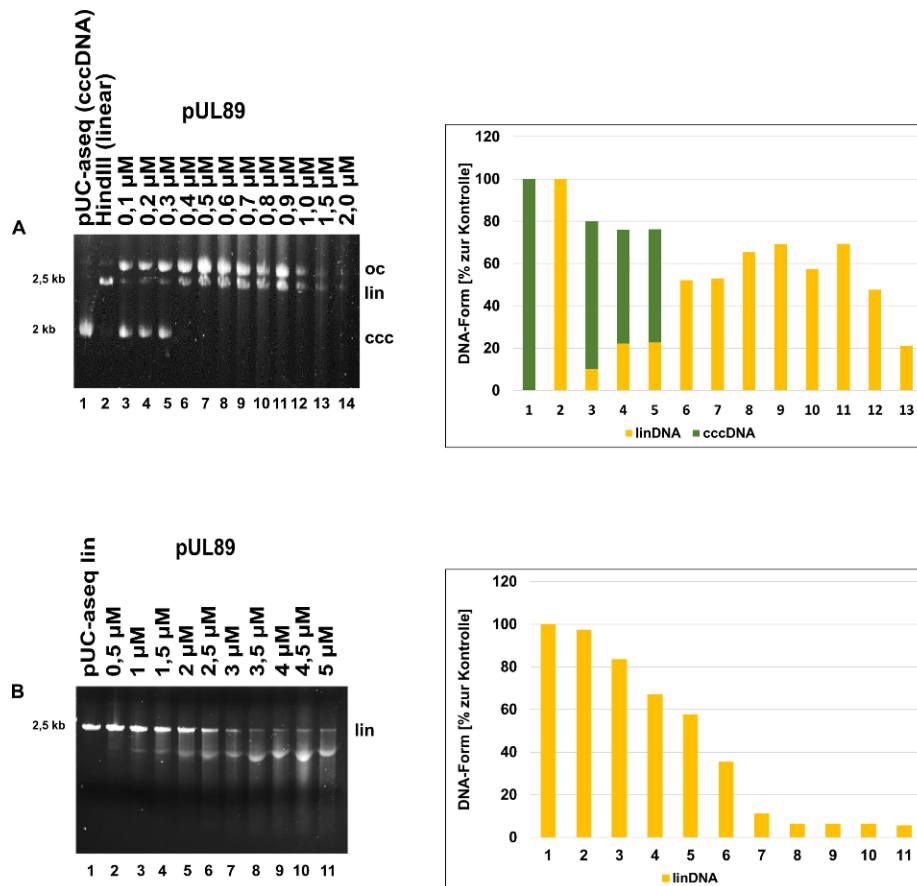
Es wurden Analysen hinsichtlich der benötigten Konzentration des Gesamtproteins für die Spaltung von zirkulärer und linearer DNA, der Hemmung durch den Terminase-Inhibitor *2-Bromo-5,6-dichloro-1-beta-Dribofuranosyl benzimidazole* (BDCRB, s. Seite 28) sowie die Nuklease-Aktivität der generierten pUL89-sub D463A, E534A, R544A, H565A, H571A, D651A durchgeführt. Die Proteine wurden in HEK-293T-Zellen exprimiert (s. Seite 46), gereinigt (s. Seite 52-53) und für die Nuklease-Untersuchungen (s. Seite 59-60) eingesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation der Ansätze bei 37°C, wurden diese mit Proteinase K versetzt (1 mg/ ml) und für weitere 60 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe einer 0,8 %-Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem Programm *Phoretix 1D* (Totalab Ltd., Newcastle upon Tyne; Großbritannien) quantifiziert.



## Ergebnisse

### 4.3.2.1 Charakterisierung der Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89

Zu Beginn wurde die benötigte Proteinkonzentration, für die Spaltung der kovalent-geschlossenen, zirkulären DNA (ccc) sowie der linearen DNA (lin) bestimmt. Als Substrat für die Untersuchungen wurde das Plasmid pUC-aseq (s. Seite 15), welches eine einzelne Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *HindIII* aufweist, verwendet. Das Plasmid kodiert für die  $\alpha$ -Sequenz von HCMV. Innerhalb dieser Sequenz liegen die *packaging* Motive *pac1* und *pac2*, welche bei der DNA-Verpackung durch die zweite Terminaseuntereinheit pUL56 gebunden werden. Es wurden 600 ng cccDNA bzw. 250 ng lin DNA pro Ansatz eingesetzt. Die Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins wurde in Abhängigkeit einer Proteinkonzentration von 0,1-5  $\mu$ M untersucht.



**Abbildung 17: Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89.** (A) Konzentrationsabhängige Spaltung der cccDNA von pUC-aseq (600 ng) mit Quantifizierung. Spur eins zeigt das zirkuläre pUC-aseq, Spur zwei zeigt die lineare DNA von pUC-aseq (+*HindIII*). Die Spuren drei bis 14 zeigen die Nuklease-Aktivität bei zunehmender pUL89-Konzentration (0,1-2,0  $\mu$ M). (B) Konzentrationsabhängige Spaltung der linDNA von pUC-aseq (pUC-aseq lin, 250 ng) mit Quantifizierung. Spur eins zeigt die lineare DNA von pUC-aseq (+*HindIII*). Die Spuren zwei bis elf zeigen die Nuklease-Aktivität bei zunehmender pUL89-Konzentration (0,5-5  $\mu$ M) (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

## Ergebnisse

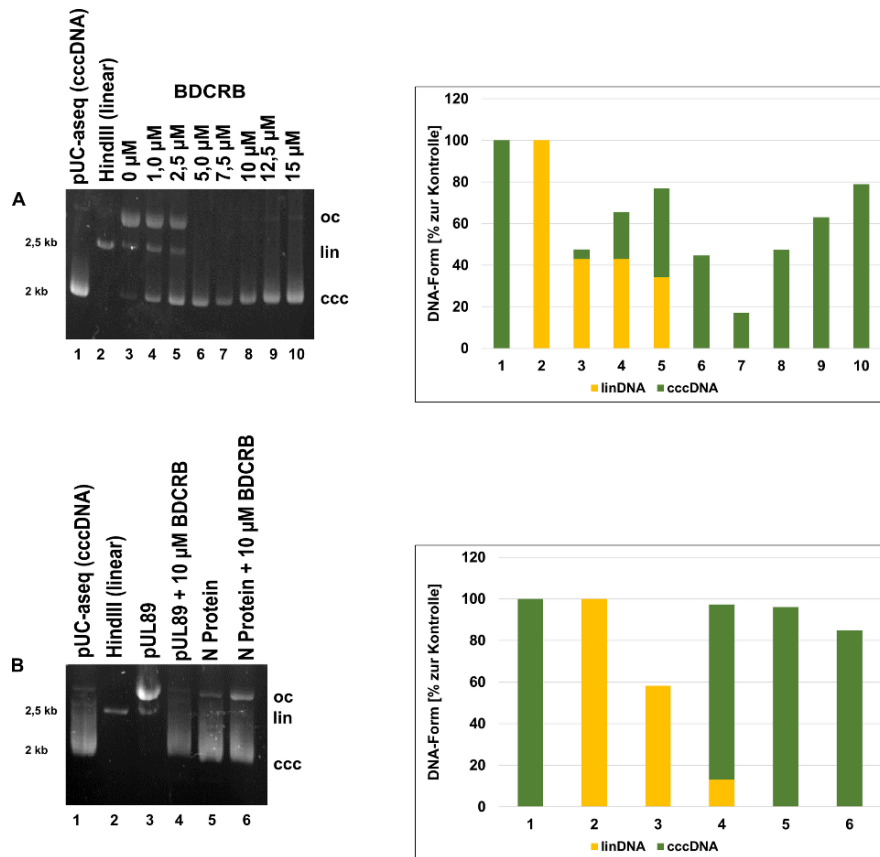
Abbildung 17A zeigt die konzentrations-abhängige Spaltung des zirkulären Substrats pUC-aseq durch das Gesamtprotein pUL89. Es wurden 600 ng Substrat pro Reaktion eingesetzt, welche in Spur eins abgebildet sind. Spur zwei zeigt die lineare Form von pUC-aseq, welche durch die Inkubation mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* entsteht. Die Spuren drei bis 14 zeigen die Inkubation des zirkulären pUC-aseq mit steigenden pUL89-Konzentrationen. Das zirkuläre Plasmid pUC-aseq wird durch pUL89 in eine lineare (lin) und offen-zirkuläre (oc) Form gespalten. Während bei den Proteinkonzentrationen von 0,1-0,3  $\mu\text{M}$  (Spuren drei bis fünf) neben den Spaltungsprodukten lin- und ocDNA ebenfalls noch ca. 10-20 % cccDNA vorhanden ist, kann ab einer Proteinkonzentration von 0,4  $\mu\text{M}$  (Spur sechs) kein Substrat mehr detektiert werden. Bei dieser Konzentration liegt 50 % der DNA in der linearen Form vor. Dieser Anteil steigt bis zu einer Proteinkonzentration von 0,7  $\mu\text{M}$  (Spur neun) auf ca. 70 % an. Bei höheren Proteinkonzentrationen wird auch die lineare DNA in kleinere Fragmente gespalten, sodass der Anteil abnimmt. So liegen bei einer Proteinkonzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  (Spur 13) 20 % der DNA als linear vor und bei 2,0  $\mu\text{M}$  (Spur 14) beträgt der Anteil ca. 15 %. Für die folgenden Versuche wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Proteinkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt<sup>98</sup>.

In Abbildung 17B ist die konzentrations-abhängige Spaltung von linearer DNA (pUC-aseq-lin, 250 ng) durch pUL89 dargestellt. Spur eins zeigt 250 ng pUC-aseq lin. Die Spuren zwei bis elf zeigen die Inkubation mit einer steigenden pUL89-Konzentration. Die lineare DNA wird von pUL89 in kleinere Fragmente gespalten, sodass eine Art „Schmier“ auf dem Agarosegel entsteht. Bei geringen Proteinkonzentrationen wie 0,5  $\mu\text{M}$  (Spur zwei) spaltet pUL89 nur einen geringen Teil der linDNA, sodass bei dieser Konzentration noch ca. 95 % des Substrates intakt ist. Im Vergleich dazu führt der Einsatz einer höheren Proteinkonzentration wie 2,5  $\mu\text{M}$  (Spur sechs) zu einem Abfall des linDNA-Anteils auf ca. 35 %. Bei der am höchsten eingesetzten Proteinkonzentration (5  $\mu\text{M}$ , Spur elf) liegt ca. 5 % der DNA in der linearen Form vor<sup>98</sup>.

In Abbildung 18A ist die Hemmung der Nuklease-Aktivität durch den Terminase-Inhibitor BDCRB dargestellt. Die Spuren eins und zwei zeigen die ccc- und lin-Form von pUC-aseq. In Spur drei ist die Spaltungsaktivität von 0,5  $\mu\text{M}$  pUL89 dargestellt, als Spaltungsprodukte treten lin- und ocDNA auf. Die Spuren vier bis zehn zeigen die Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor BDCRB. Durch die Zugabe von geringen BDCRB-Konzentrationen wie 1,0  $\mu\text{M}$  (Spur vier) und 2,5  $\mu\text{M}$  (Spur fünf) wird die Aktivität von pUL89 nur partial gehemmt und es treten weiterhin die Spaltungsprodukte lin

## Ergebnisse

und oc auf. So liegt bei 2,5  $\mu\text{M}$  (Spur fünf) ca. 35 % der DNA in linearer Form vor. Ab einer BDCRB-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  (Spur sechs) sind diese Spaltungsprodukte nicht mehr detektierbar und der Anteil der cccDNA steigt. Bei 5  $\mu\text{M}$  BDCRB liegt ca. 45 % der DNA als cccDNA vor. Bei der am höchsten getesteten Konzentration von BDCRB (15  $\mu\text{M}$ , Spur zehn) liegt ca. 80 % der DNA als cccDNA vor.



**Abbildung 18: Inhibition der Nuklease-Aktivität und Vergleich mit dem N Protein (Hantavirus, Sangassou).** (A) Hemmung der Nuklease-Aktivität von 0,5  $\mu\text{M}$  pUL89 durch die Zugabe des Terminase-Inhibitors BDCRB mit Quantifizierung. Spur eins zeigt das zirkuläre pUC-aseq, Spur zwei zeigt die lineare Form von pUC-aseq (+HindIII). Die Spuren drei bis zehn zeigen die zunehmende Hemmung durch BDCRB (0-15  $\mu\text{M}$ ). (B) Vergleich der Nuklease-Aktivitäten der viralen Proteine pUL89 (HCMV) und N Protein (Hantavirus, Sangassou) mit Quantifizierung. Spur eins zeigt die zirkuläre DNA von pUC-aseq. Spur zwei zeigt die lineare Form von pUC-aseq (+HindIII). Nachfolgend ist die Spaltung von pUC-aseq durch 0,5  $\mu\text{M}$  pUL89 (Spur drei), die Hemmung der pUL89 Nuklease-Aktivität durch 10  $\mu\text{M}$  BDCRB (Spur vier), die Nuklease-Aktivität von 0,5  $\mu\text{M}$  N Protein (Spur fünf) und die Hemmung der Nuklease-Aktivität des N-Proteins durch 10  $\mu\text{M}$  BDCRB (Spur sechs) dargestellt (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

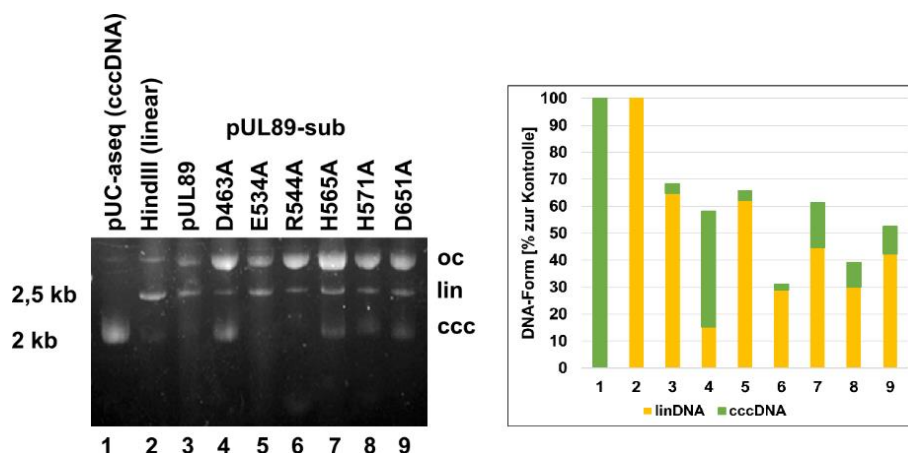
In Abbildung 18B ist vergleichend die Nuklease-Aktivität der Terminase-Untereinheit pUL89 und des N Proteins des Hantavirus der Art Sangassou dargestellt. In diesem Protein konnte bisher keine Nuklease-Aktivität nachgewiesen werden, sodass es als Negativkontrolle diente. Die Spuren eins und zwei zeigen die ccc- und lin-Form von pUC-aseq. In Spur drei ist die Nuklease-Aktivität von 0,5  $\mu\text{M}$  pUL89 dargestellt. Das

## Ergebnisse

Protein spaltet die cccDNA in eine lin- und oc-Form (58 % linDNA). Spur vier zeigt die Hemmung der Nuklease-Aktivität von pUL89 durch die Zugabe von 10  $\mu$ M BDCRB. Nach Zugabe des spezifischen Terminase-Inhibitors liegt die DNA größtenteils als cccDNA vor (13,2 % linDNA, 84% cccDNA). In den Spuren fünf und sechs ist die Nuklease-Aktivität des N Proteins des Hantavirus (Sangassou) sowie deren Hemmung durch BDCRB dargestellt. Trotz einstündiger Behandlung mit diesem viralen Protein liegt die DNA als cccDNA vor (Spur fünf, 96 % cccDNA). Ebenso liegt die DNA nach der Zugabe von BDCRB in der zirkulären Form vor (Spur sechs, 85 % cccDNA).

### 4.3.2.2 Nuklease-Aktivität der Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub)

Zur Überprüfung der Nuklease-Aktivität der pUL89-sub D463A, E534A, R544A, H565A, H571A und D651A wurden 600 ng pUC-aseq mit den rekombinanten Proteinen für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mg/ ml Proteinase K und eine Inkubation bei 65°C für 1 h. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines 0,8 % Agarosegels (s. Seite 59-60).



**Abbildung 19: Nuklease-Aktivität der Alanin-Austauschmutanten (pUL89-sub) im Vergleich zum Wildtyp-Protein pUL89.** Spur eins zeigt die zirkuläre Form von pUC-aseq. In Spur zwei ist die lineare Form von pUC-aseq (+HindIII) dargestellt. Spur drei zeigt die Nuklease-Aktivität von 0,5  $\mu$ M pUL89. Die Spuren vier bis neun zeigen die Aktivität von 0,5  $\mu$ M der pUL89-sub (D463A, Spur vier; E534A, Spur fünf; R544A, Spur sechs; H565A, Spur sieben; H571A, Spur acht, D651A, Spur neun). Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Nuklease-Aktivität der einzelnen Proteine (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

In den Spuren eins und zwei der Abbildung 19 sind die ccc- und lin-Form von pUC-aseq dargestellt. Die Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89 in der dritten Spur diente als Kontrolle und zur Quantifizierung der ermittelten Nuklease-Aktivitäten der pUL89-sub. Nach Zugabe des Wildtyp-Proteins pUL89 wird die cccDNA in oc- und linDNA gespalten. Anhand der Quantifizierung konnte festgestellt werden, dass die

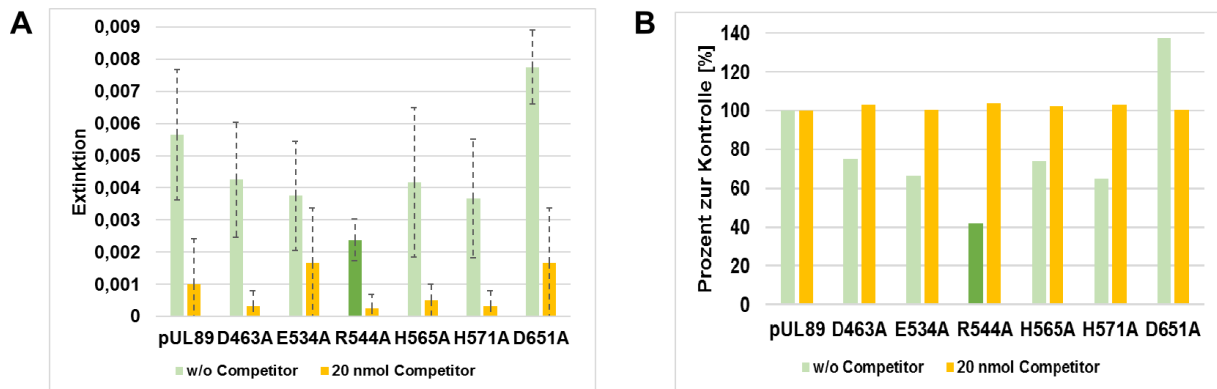
## Ergebnisse

DNA nach Inkubation mit dem Wildtyp-Protein zu 65 % in der linearen Form und zu 3,5 % als cccDNA vorliegt. Die Spuren vier bis neun zeigen die Ergebnisse der Alanin-Austauschmutanten pUL89-sub. Ähnliche Ergebnisse wie das Wildtyp-Protein zeigten E534A (Spur fünf, 62 % lin, 4 % cccDNA) und R544A (Spur sechs, 29 % lin, 2,5 % cccDNA). Im Vergleich dazu zeigten die drei Alanin-Austauschmutanten H565A (Spur sieben, 45 % lin, 17 % cccDNA), H571A (Spur acht, 30 % lin, 9 % cccDNA) und D651A (Spur neun, 42 % lin, 10 % cccDNA) eine minimal geringere Aktivität als pUL89. Im Gegensatz zu den übrigen Proteinen zeigte die Mutation D463A (Spur vier) einen erheblichen Einfluss auf die Nuklease-Aktivität der Terminase-Untereinheit pUL89. Diese Mutation führte zu einem linearen Anteil von ca. 15 %, während ca. 43 % der DNA als cccDNA vorlag<sup>98</sup>.

### 4.3.3 Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften der Terminase-Untereinheit pUL89 oder pUL89-sub

Ergänzend zu der Nuklease-Funktion besitzt pUL89 eine Bindungseigenschaft von doppelsträngiger DNA (dsDNA). Einen Einfluss der generierten Mutanten auf diese funktionelle Eigenschaft des Proteins wurde mit Hilfe von *in vitro* kolorimetrischen DNA-Bindungsuntersuchungen analysiert. Die Expression der Proteine im eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 ermöglichte nicht nur eine Aufreinigung über eine IMAC, sondern auch die Verwendung der exprimierten Proteine in dieser Untersuchung. Der Nachweis der DNA-Bindung basiert auf der Interaktion der His<sub>6</sub>-markierten Proteine mit den immobilisierten Nickel-Ionen auf einer 96-well-Mikrotiterplatte, sowie auf die starke Bindung zwischen dem Avidin-Primärantikörper und der Biotin-markierten dsDNA-Probe. Zu Beginn wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 2,5 µg pUL89 oder pUL89-sub beladen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich ein weiterer Waschschrift an, auf dem die 10-minütige-Beladung mit der Biotin-gekoppelten DNA folgte. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper Extravidin-HRP. Die Kopplung von Extravidin mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) ermöglichte eine visuelle Auswertung bei 620 nm nach einer 15-minütigen-Inkubation mit dem Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Ergänzend wurden Spezifitätsversuche mit 100x Überschuss nicht-markierter DNA durchgeführt (s. Seite 58-59).

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Untersuchung der dsDNA-Bindungseigenschaften von pUL89 und pUL89-sub. (A)** Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von pUL89 und pUL89-sub mit Hilfe des kolorimetrischen DNA-Bindungsversuchs. Die y-Achse zeigt die gemessene Extinktion bei 620 nm und die x-Achse die untersuchten viralen Proteine (pUL89, D463A, E534A, R544A, H565A, H571A, D651A). **(B)** Normierung der gemessenen Extinktionswerte bei 620 nm. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil im Vergleich zum Wildtyp-Protein pUL89 und die x-Achse die untersuchten Proteine (pUL89, D463A, E534A, R544A, H565A, H571A, D651A) (modifiziert nach Theiß et al. 2019<sup>98</sup>).

Abbildung 20A zeigt die Ergebnisse der kolorimetrischen DNA-Bindungsbestimmung von pUL89 und den pUL89-sub D463A, E534A, R544A, H565A, H571A und D651A. Während in Abbildung 20B die Normierung dieser Ergebnisse grafisch dargestellt ist. Die Alanin-Austauschmutanten D463A (75 %), E534A (66 %), H565A (74 %) und H571A (65 %) zeigen ein ähnliches DNA-Bindungsverhalten wie das Wildtyp-Protein pUL89 (100 %). Die Mutation D651A hingegen besitzt einen verstärkenden Effekt (D651A 137 %) auf die DNA-Bindungseigenschaften des Proteins.

Im Gegensatz dazu weist die Mutation der Aminosäure Arginin 544 (R544) einen essenziellen Einfluss auf die DNA-Bindung der Terminase-Untereinheit pUL89 auf. Die Mutation zu Alanin führte zu einer signifikanten Verringerung der DNA-Bindungsfähigkeit um 58 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Nach einer statistischen Auswertung mit Hilfe des T-Tests konnte eine Signifikanz mit dem Niveau von  $\alpha = 0,05$  festgestellt werden. Durch die Zugabe von 100x Überschuss nicht-markierter DNA (*Competitor*) konnte die DNA-Bindung von pUL89 oder pUL89-sub unterbunden werden<sup>98</sup>.

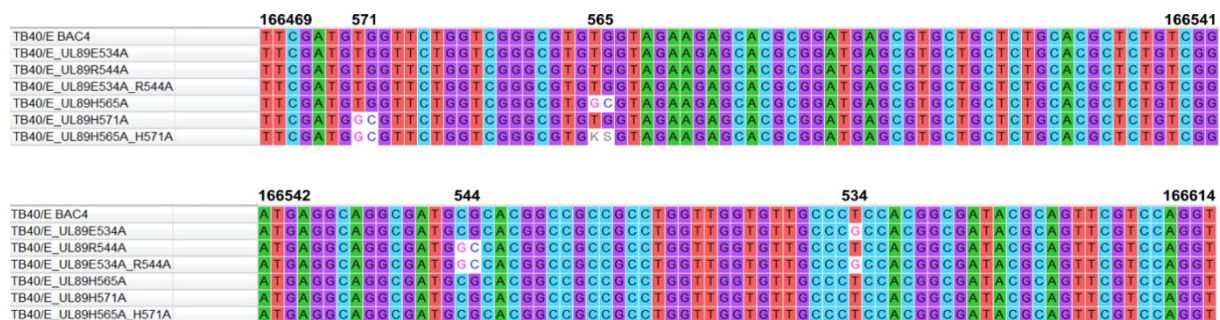
## Ergebnisse

### 4.4 Klonierung von rekombinanten BAC-Mutanten (*bacterial arteficial chromosomes*) mit Hilfe der *En Passant* Mutagenese

Zur Überprüfung der *in vitro* Ergebnisse der Alanin-Austauschmutanten wurden rekombinante Viren mit Hilfe der *En Passant* Mutagenese (s. Seite 33-37) erstellt. Basierend auf der einfachen Durchführung sowie der Anwendung von molekularbiologischen Klonierungsstrategien wurden *Bacterial arteficial chromosomes* (BACs) für die Herstellung der rekombinanten Viren verwendet.

TB40/E BAC 4 (s. Seite 12) wurde für die Rekonstitution des Wildtyp-Virus TB40/E verwendet, während das Konstrukt pEPkan-S (s. Seite 15-16) als *Template* für die Mutagenese-PCR diente. Die *En Passant* Mutagenese basiert auf zwei Rekombinationseignissen, welche zur Insertion der gewünschten Mutation, Insertion oder Deletion führen. Nach Herstellung der rekombinanten BACs erfolgte eine Überprüfung der Klone mittels Sanger Sequenzierung<sup>78</sup>

Die Genom-Integrität des Wildtyps TB40/E BAC 4 sowie die durch die *En Passant* Mutagenese hergestellten rekombinanten BAC-Mutanten wurde durch eine *Next-Generation* Sequenzierung (NGS, s. Seite 37) überprüft. Es wurde eine Illumina *MiSeq*<sup>79</sup> durch die Firma Seq-IT GmbH u. Co. KG (Kaiserslautern, Deutschland) durchgeführt, wobei die Illumina *NExtera XT library preparation* und das *Mapping* durch die genannte Firma unternommen wurde.



**Abbildung 21: Sequenzvergleich des Wildtyp-BAC TB40/E BAC 4 und der erstellten rekombinanten BAC-Mutanten.** Der dargestellte Genombereich liegt zwischen den Kodons 166469 und 166614. *UL89* wird durch zwei Exons kodiert die revers im BAC vorliegen. Die Mutationsstellen sind durch die Angabe der Aminosäuren-Nummerierung in *UL89* gekennzeichnet (534, 544, 565, 571). K bezeichnet G/T und S G/C. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *MEGA7* durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt einen Sequenzvergleich der Mutagenese-Region im Exon 2 von *UL89*. Der IUPAC Nukleotid-Code ist in Tabelle 26 (s. Anhang) dargestellt. Bis auf die eingefügten Mutationen stimmen die Sequenzen des Wildtyp-BAC und der rekombinanten Mutanten im *open reading frame* (ORF) *UL89* überein. Die Terminase-Untereinheit *UL89* wird durch zwei Exons kodiert die durch ein ca. 3900 bp langes



## Ergebnisse

Intron getrennt sind. Des Weiteren liegt UL89 revers im BAC vor. Ergänzend zu den eingefügten Mutationen im ORF *UL89* konnte in dem BAC-Konstrukt TB40/E\_UL89H565A, H571A eine weitere Mutation an der Genomstelle 32653 festgestellt werden. Es handelt sich dabei um eine Intron-Region zwischen *US34A* (28919-29113) und *RL1* (34098-35030). Bei dieser BAC-Mutante konnte ein Austausch von Guanin zu Cytosin detektiert werden. In den anderen Konstrukten konnten keine, bis auf die eingefügten Mutationen, identifiziert werden.

Die Rekonstitution der BAC-Konstrukte erfolgte mit Hilfe des Nucleofector™ 2b der Firma Lonza Group AG (Köln) und des Basic Nucleofector™ Kits for Primary Mammalian Fibroblasts in HELF Fi301-Zellen (s. Seite 45-46). Bei den BACs TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A zeigte sich, dass eine Rekonstitution in HELF Fi301-Zellen nicht möglich war. Alle drei rekombinanten BAC-Mutanten zeigten einen Defekt in der Virusausbreitung. Pro Ansatz wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen verwendet, welche in der Nucleofector-Lösung resuspendiert wurden. Für jeden Ansatz wurden sowohl die BAC-DNA als auch das Expressionsplasmid pcDNA-pp71tag (s. Seite 20) vorgelegt, mit den Zellen vereint und mit dem vorinstallierten Programm A-023 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen zügig aus der Elektroporationsküvette in eine 6-well-Zellkulturplatte überführt, im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert und auf Ausbildung eines cytopathischen Effektes (CPE) beobachtet. Nach Generierung eines Virusstocks und Titerbestimmung mit Hilfe eines Plaque-Reduktionstestes konnten die rekombinanten Viren für Charakterisierungsversuche eingesetzt werden.

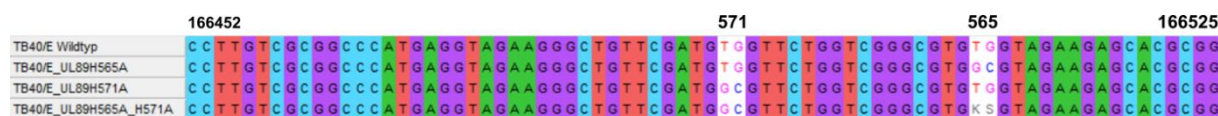
### 4.4.1 Charakterisierung der Histidin-Virusmutanten

Die rekonstituierten Histidin-Virusmutanten sollten molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen unterzogen werden, um Unterschiede zum Wildtyp-Virus TB40/E zu identifizieren. Zunächst wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt, um Unterschiede hinsichtlich der Replikationsfähigkeit feststellen zu können. Anschließend wurde die virale Proteinexpression durch Western-Blot-Analysen, sowie indirekter Immunfluoreszenz näher charakterisiert. Die rekombinanten Viren wurden auf strukturelle Unterschiede zum Wildtyp-Virus mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen analysiert. Abschließend wurde der Einfluss der Mutationen auf die Spaltung der konkatemeren, viralen DNA, sowie die Bindung von dsDNA untersucht. Für die Versuche wurden rekombinanten Viren bis zu einer Passage von 6 eingesetzt.



## Ergebnisse

Des Weiteren wurde bei den Viren der Passage 6 eine DNA-Extraktion durchgeführt. Die extrahierte DNA von TB40/E, TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A wurde ebenfalls mit Hilfe einer *Next-Generation Sequenzierung* (NGS, s. Seite 37) durch die Firma Seq-IT GmbH u. Co. KG (Kaiserslautern, Deutschland) analysiert. Abbildung 22 zeigt einen Sequenzvergleich der extrahierten DNA der Viren TB40/E, TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A der Passage 6 im Bereich des Exons 2 des ORF *UL89*. Der IUPAC Nukleotid-Code ist in Tabelle 26 (s. Anhang) dargestellt.



**Abbildung 22: Überprüfung der Mutagenese-Region im *UL89*-Exon 2 der rekombinanten Viren der Passage 6.** Der dargestellte Genombereich liegt zwischen den Kodons 166452 und 166525. Der Bereich befindet sich im Exon 2 von *UL89*. Die Mutationsstellen sind durch die Angabe der Aminosäuren-Nummerierung in *UL89* gekennzeichnet (565, 571). K bezeichnet G/T und S G/C. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *MEGA7* durchgeführt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die eingefügten Mutationen stabil in das virale Genom inseriert und in den rekombinanten Viren der Passage 6 identifiziert werden konnten. Des Weiteren konnten bis zu 50 Mutationen in der Intron-Region (33795-33939) zwischen den Genen *US34A* (28919-29113) und *RL1* (34098-35030) in den Virus-Mutanten TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A festgestellt werden (s. Anhang Tabelle 27).

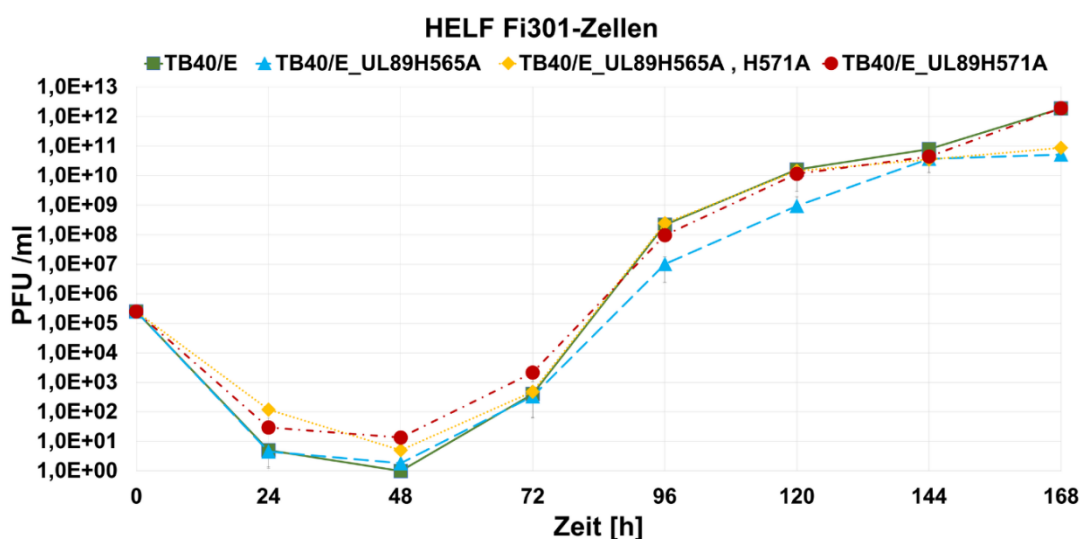
### 4.4.1.1 Wachstumskinetik der rekombinanten Histidin-Virusmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E

Nach Rekonstitution der rekombinanten Histidin-BAC-Mutanten, Gewinnung eines Virusstocks und einer Titerbestimmung mit Hilfe eines Plaque-Reduktionsassays wurde eine Wachstumskinetik (s. Seite 48) zur Überprüfung der charakteristischen Wachstumseigenschaften der jeweiligen Mutanten durchgeführt. HELF Fi301-Zellen wurden in 24 *well*-Zellkulturplatten (5\*10<sup>4</sup> Zellen/ Vertiefung) ausgesät und zwei Tage später mit einer MOI von 1 für 90 min infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (s. Seite 28) gewaschen und mit 500 µl EMEM/ 2 % FBS (s. Seite 27) pro Vertiefung überschichtet. Die Überstände wurden zu einem entsprechenden Zeitpunkt nach

## Ergebnisse

der Infektion (24 h p.i.- 168 h p.i.) abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Im zweiten Schritt der Wachstumskinetik wurden HELF Fi301-Zellen in 12 *well*-Zellkulturplatten ( $1 \cdot 10^5$  Zellen/ Vertiefung) ausgesät und zwei Tage später mit den Überständen für 90 min infiziert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Methocel (s. Seite 27-28) überschichtet. Methocel verhindert die Abgabe der gebildeten Viren, sodass lediglich eine Infektion über Zell-Zell-Kontakte möglich ist. Dies führt zu der Annahme, dass jede infizierte Zelle einen CPE ausbildet.



**Abbildung 23: Wachstumskinetik der rekombinanten Histidin-Virusmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E.** Wachstumskinetik der auf HELF Fi301-Zellen rekonstituierten Histidin-Virusmutanten. Dargestellt ist die Wachstumskinetik von TB40/E (Grün), TB40/E\_UL89H565A (Türkis), TB40/E\_UL89H571A (Rot) und TB40/E\_UL89H565A, H571A (Gelb).

Abbildung 23 zeigt die Wachstumskinetik der rekombinanten Histidin-Virusmutanten, welche auf HELF Fi301-Zellen rekonstituiert wurden. Als Referenz wurde auch die Wachstumskinetik des Wildtyp-Virus TB40/E (Grün) ermittelt. Die Mutante TB40/E\_UL89H571A (Rot) zeigt die gleichen Wachstumseigenschaften wie das Wildtyp-Virus. Im Vergleich dazu zeigen die beiden Mutanten TB40/E\_UL89H565A (Türkis) und TB40/E\_UL89H565A, H571A (Gelb) ein leicht verringertes Wachstum im spätesten Zeitpunkt der Infektion. Bis zum Zeitwert von 144 h p.i. zeigt sich ein ähnliches Wachstum wie beim Wildtyp-Virus und der Mutante TB40/E\_UL89H571A, jedoch weicht der letzte Zeitwert (168 h p.i.), durch eine Reduktion um eine  $\log_{10}$ -Stufe, von dem des Wildtyp-Virus ab.

## Ergebnisse

### 4.4.1.2 Nachweis der viralen Proteinexpression der Histidin-Virusmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E

Anschließend an die Wachstumskinetik der rekombinanten Histidin-Virusmutanten TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A sollte die virale Proteinexpression dieser Mutanten hinsichtlich Unterschiede zum Wildtyp-Virus TB40/E charakterisiert werden. Zur Durchführung dieser Untersuchung wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot (s. Seite 57-58) als auch indirekte Immunfluoreszenz (s. Seite 50) untersucht.

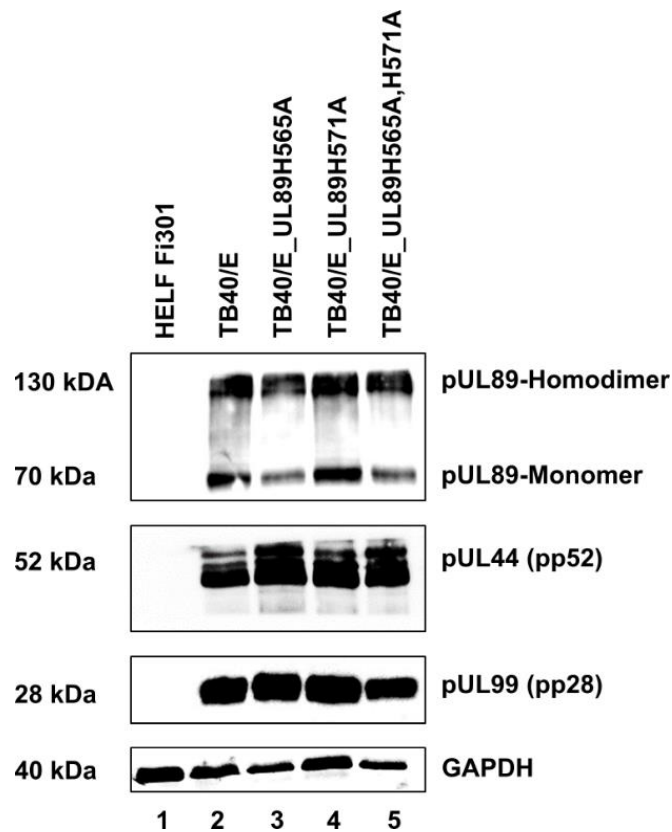
#### 4.4.1.2.1 Charakterisierung der Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse

Zur Untersuchung der viralen Proteinexpression wurden HELF Fi301-Zellen mit dem Wildtyp-Virus TB40/E bzw. den Histidin-Virusmutanten TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A oder TB40/E\_UL89H565A, H571A infiziert (MOI = 1) und 96 h p.i. geerntet. Nach Sedimentation der Zellen wurden diese in RIPA-Puffer gelöst (s. Seite 54), 30 min auf Eis inkubiert und abschließend für 30 min bei 4°C und 15.300 x g sedimentiert. Der gewonnene Zellextrakt wurde für eine SDS-Tricin-PAGE (s. Seite 55-56) verwendet bzw. bei -20°C gelagert. Nach Durchführung der SDS-Tricin-PAGE wurde diese mittels Western Blot (s. Seite 57-58) analysiert.

Abbildung 24 zeigt die Analyse der viralen Proteinexpression der Histidin-Virusmutanten (Spuren drei bis fünf) im Vergleich zum Wildtyp-Virus (Spur zwei) und nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen (Spur eins). Der Zellextrakt der nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen reagierte mit keinem verwendeten monoklonalen Antikörper gegen die HCMV-Proteine pUL89, pUL44 oder pUL99. Der monoklonale Antikörper  $\alpha$ -GAPDH diente als Ladungskontrolle. Vergleichend zu den nicht-infizierten HELF Fi301 (Spur eins) zeigten alle Zellextrakte der infizierten Zellen eine deutliche Reaktion mit den monoklonalen Antikörper gegen die CMV-spezifische-Proteine. Mit dem  $\alpha$ -pUL89-Antikörper konnten zwei abundante Proteinbanden bei ca. 70 und 130 kDa detektiert werden. Bei diesen Banden handelt es sich um das pUL89-Monomer und -Homodimer. Der Antikörper  $\alpha$ -pUL44 ermöglichte die Detektion einer Proteinbande bei ca. 52 kDa, bei dem es sich um das pUL44-Monomer handelt. Des Weiteren konnte mit dem Antikörper  $\alpha$ -pUL99 eine Proteinbande bei 28 kDa nachgewiesen werden, bei dem es sich um das Monomer des Tegumentprotein pUL99 handelt. Die Proteinexpressionslevel

## Ergebnisse

von TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A zeigten keinen signifikanten Unterschied zu dem des Wildtyp-Virus TB40/E.



**Abbildung 24: Analyse der viralen Proteinexpression der Histidin-Virusmutanten.** Spur eins zeigt den Zellextrakt von nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen. Spur zwei zeigt den Zellextrakt von TB40/E-infizierten HELF Fi301-Zellen (MOI = 1). HELF Fi301-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit TB40/E\_UL89H565A (Spur drei), TB40/E\_UL89H571A (Spur vier) und TB40/E\_UL89H565A, H571A (Spur fünf) infiziert. Als monoklonale Primärantikörper wurden  $\alpha$ -pUL89,  $\alpha$ -pUL44,  $\alpha$ -pUL99 und als Ladungskontrolle  $\alpha$ -GAPDH verwendet.

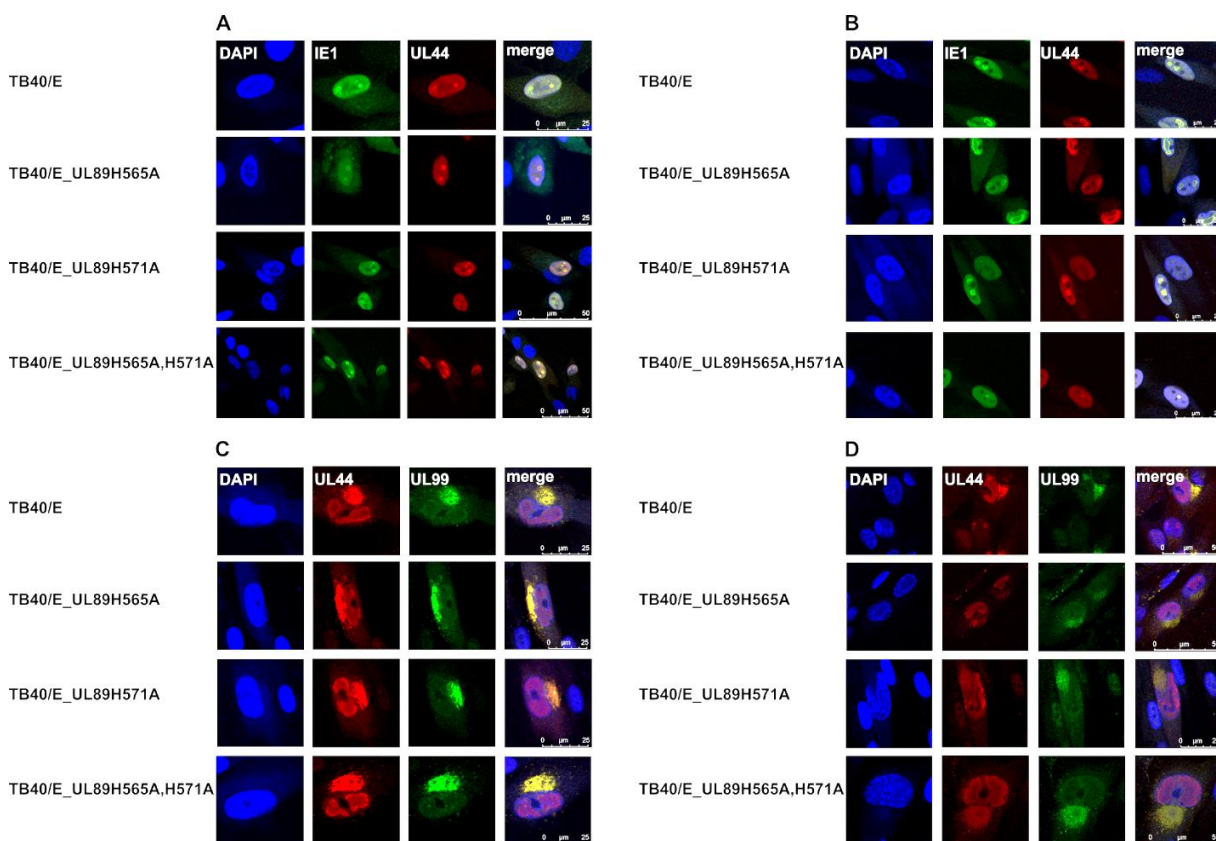
### 4.4.1.2.2 Charakterisierung der Proteinexpression durch indirekte Immunfluoreszenz

Zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz wurden HELF Fi301-Zellen in 24 well-Zellkulturplatten ausgesät ( $5 \cdot 10^4$  Zellen/ Vertiefung), welche vorher mit Deckgläschen versehen wurden. Nach zweitägiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die Zellen mit TB40/E bzw. TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A oder TB40/E\_UL89H565A, H571A für 90 min infiziert (MOI = 1). Nach erfolgter Infektion wurden die Vertiefungen mit 1 ml EMEM/ 2 % FBS überschichtet und bis zu einem bestimmten Zeitpunkt im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert und die Immunfluoreszenz-

## Ergebnisse

Färbungen durchgeführt (s. Seite 50). Die Deckgläschen wurden mit einer Fluoromount-G/ DAPI-Lösung auf einem Objektträger fixiert und am darauffolgenden Tag mit durchsichtigem Nagellack konserviert. Die Objektträger wurden im Dunkeln aufbewahrt.

Abbildung 25 zeigt die Analyse der viralen Proteinexpression mittel indirekter Immunfluoreszenz. Während IE1 und pUL44 im Nukleus nachweisbar sind, konnte pUL99 im Cytoplasma lokalisiert werden. Alle drei spezifischen HCMV-Proteine konnten in den Histidin-Virusmutanten mit den gleichen Expressionsraten wie im Wildtyp-Virus TB40/E nachgewiesen werden. Ergänzend wurde der Kern mittels DAPI markiert und die Immunfluoreszenz-Bilder überlagert um eine bessere Visualisierung zu ermöglichen (*merge*-Bild).



**Abbildung 25: Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz der Histidin-Virusmutanten.** Als Positivkontrolle wurde auch die Immunfluoreszenz-Färbung für das Wildtyp-Virus TB40/E durchgeführt. **(A)** Immunfluoreszenz 24 h p.i. (MOI = 1) gegen die spezifischen Antikörper  $\alpha$ -IE1 und  $\alpha$ -pUL44. **(B)** Immunfluoreszenz 48 h p.i. (MOI = 1) gegen die spezifischen Antikörper  $\alpha$ -IE1 und  $\alpha$ -pUL44. **(C)** Immunfluoreszenz 72 h p.i. (MOI = 1) gegen die spezifischen Antikörper  $\alpha$ -pUL44 und  $\alpha$ -pUL99. **(D)** Immunfluoreszenz 96 h p.i. (MOI = 1) gegen die spezifischen Antikörper  $\alpha$ -pUL44 und  $\alpha$ -pUL99. Der Nukleus wurde mit DAPI angefärbt, während das *merge*-Bild die Überlagerung der Immunfluoreszenz-Bilder zeigt.

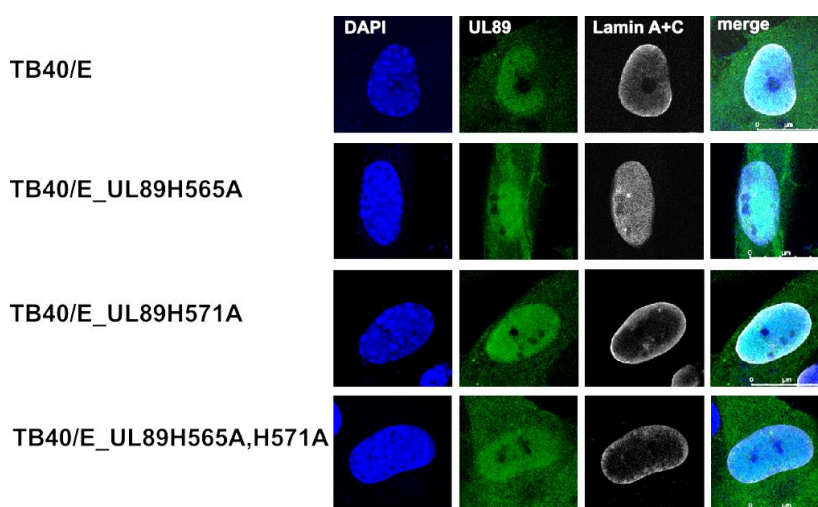
Nach Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz konnte das Ergebnis der Western Blot-Analyse bestätigt werden, TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und

## Ergebnisse

TB40/E\_UL89H565A, H571 zeigen keinen signifikanten Unterschied in der viralen Genexpression im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E.

### 4.4.1.3 Lokalisation von pUL89 in den Histidin-Virusmutanten

Um einen Einfluss der eingefügten Mutationen auf die Lokalisation von pUL89 zu untersuchen wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (s. Seite 50) mit dem spezifischen Antikörper  $\alpha$ -pUL89 durchgeführt. Zur besseren Visualisierung wurde eine zweite immunologische Färbung mit dem spezifischen Antikörper  $\alpha$ -Lamin A+C vorgenommen.



**Abbildung 26: Lokalisation von pUL89 im Wildtyp-Virus TB40/E und den Histidin-Virusmutanten.** Die Zellen wurden mit einer MOI = 1 infiziert und 96 h p.i. fixiert. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz gegen pUL89 und Lamin A+C durchgeführt. Der Nukleus wurde mit DAPI markiert, während das *merge*-Bild die Überlagerung der Immunfluoreszenz-Bilder darstellt.

Wie im Punkt 4.4.1.2.2 beschrieben, wurden HELF Fi301-Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten ( $5 \cdot 10^4$  Zellen/ Vertiefung) ausgesät, zwei Tage später mit dem Wildtyp-Virus TB40/E oder den Histidin-Virusmutanten infiziert (MOI = 1) und für 96 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. 96 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung gegen die Proteine pUL89 und Lamin A+C durchgeführt. Abbildung 26 zeigt neben den immunologischen Färbungen der beiden Proteine auch die DAPI-Färbung des Nukleus, sowie das *merge*-Bild (die Überlagerung der drei Färbungen). Ebenso wie im Wildtyp-Virus TB40/E konnte bei TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A eine UL89-Proteinexpression im Nukleus als auch im Cytoplasma der infizierten Zellen nachgewiesen werden.



## Ergebnisse

### 4.4.1.4 Überprüfung der Nuklease-Aktivität von pUL89 in rekombinanten Viren mit Hilfe einer Pulsfeld-Gelelektrophorese

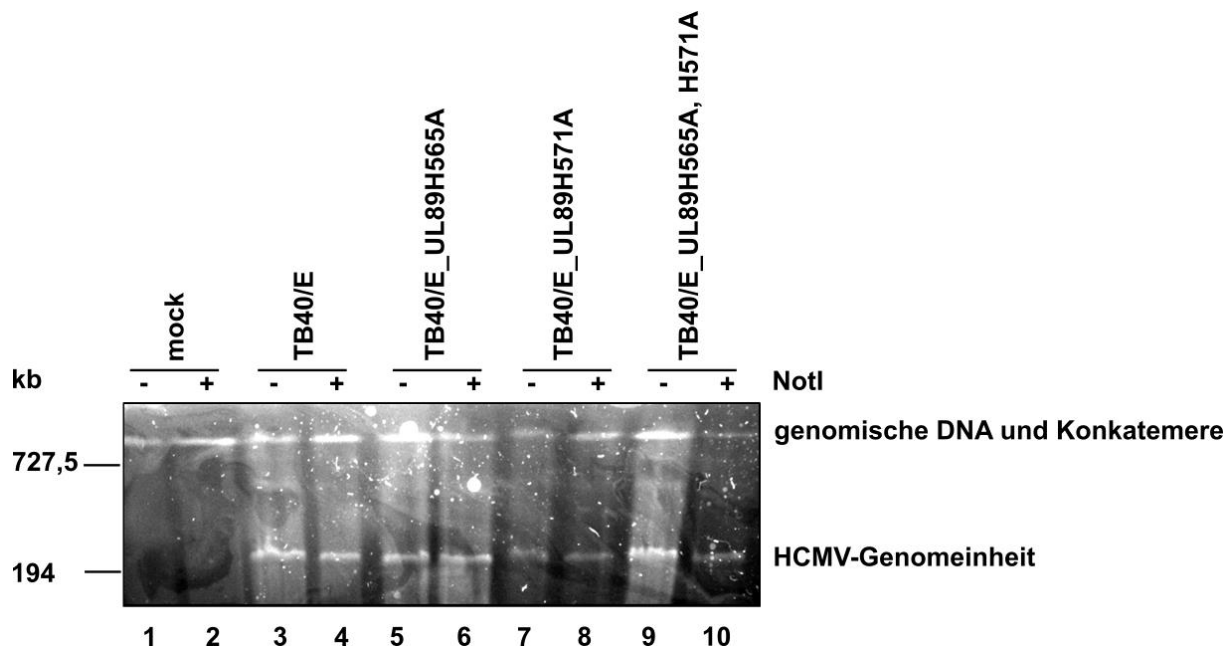
Zur Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die Spaltung der konkatemeren DNA wurde mit infizierten HELF Fi301-Zellen eine Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE, s. Seite 37-38) durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Wildtyp-Virus TB40/E oder den Histidin-Virusmutanten (MOI = 3) infiziert und 96 h p.i. geerntet. Nach Aufnahme der Zellen in Puffer L erfolgte die Einbettung mit 2% LMP-Agarose in Blöckchen-Form. Zur Freisetzung der Nukleinsäure und Abbau der zellulären und viralen Proteine wurde eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Neutralisierung der Proteinase K, sowie die Behandlung der Hälfte der Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *NotI*. Das HCMV Genom besitzt lediglich eine einzelne Schnittstelle für dieses Enzym. Es wurde vermutet, dass die Linearisierung eine bessere Visualisierung erlaubt. Nach abgeschlossener Behandlung der Agarose-Blöckchen wurden diese in ein 1%iges-Agarosegel eingebracht und mit 2% LMP-Agarose verschlossen.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese bietet gegenüber einer normalen Agarosegelelektrophorese den Vorteil, dass es möglich ist sehr große DNA-Fragmente wie z. B. virale oder bakterielle DNA über das Anlegen elektrischer Impulse aufzutrennen. Diese Impulse wechseln in einem Winkel von je 60° zur Laufrichtung. Zur Trennung der gespaltenen HCMV-Genome von der konkatemeren DNA wurde eine Elektrophorese für 20 h bei 14°C und 10 V/ cm Laufstrecke durchgeführt.

Abbildung 27 zeigt die Aufnahme der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Die Spuren eins und zwei zeigen das Ergebnis von nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen (*mock*), in denen keine HCMV-Genome nachgewiesen werden konnten. Die dritte und vierte Spur zeigen die mit TB40/E infizierten HELF Fi301-Zellen. Bei ca. 200 kb konnte eine distinkte Bande detektiert werden, bei der es sich anhand der Größe um ein HCMV-Genom handelt. In den Spuren fünf und sechs ist das Ergebnis von mit TB40/E\_UL89H565A infizierten HELF Fi301-Zellen dargestellt, während die Spuren sieben und acht die mit TB40/E\_UL89H571A infizierten Zellen zeigen. Abschließend zeigen die Spuren neun und zehn die mit TB40/E\_UL89H565A, H571A infizierten HELF Fi301-Zellen. Bei allen Histidin-Virusmutanten konnte wie beim Wildtyp-Virus eine Bande bei ca. 200 kb detektiert werden. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben +/- *NotI* beobachtet werden. Ebenso zeigen alle Proben eine weitere Bande oberhalb

## Ergebnisse

des PFGE Lambda Markers. Diese Bande stellt die genomische und konkatemere DNA da, welche aufgrund ihrer Größe nicht weiter aufgetrennt werden konnte.



**Abbildung 27 Analyse der Nuklease-Eigenschaften von pUL89 in rekombinanten Viren mit Hilfe einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).** Analysiert wurden infizierte Zellen (MOI = 3, 96 h p.i.) mit TB40/E (Spuren drei und vier), TB40/E\_UL89H565A (Spuren fünf und sechs), TB40/E\_UL89H571A (Spuren sieben und acht), TB40/E\_UL89H565A, H571A (Spuren neun und zehn) und nicht-infizierte HELF Fi301 (*mock*, Spuren eins und zwei). Die in Agarose eingebetteten Proben wurden mit Proteinease K behandelt und anschließend für die PFGE eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 10 V/cm für 20 h und 14°C.

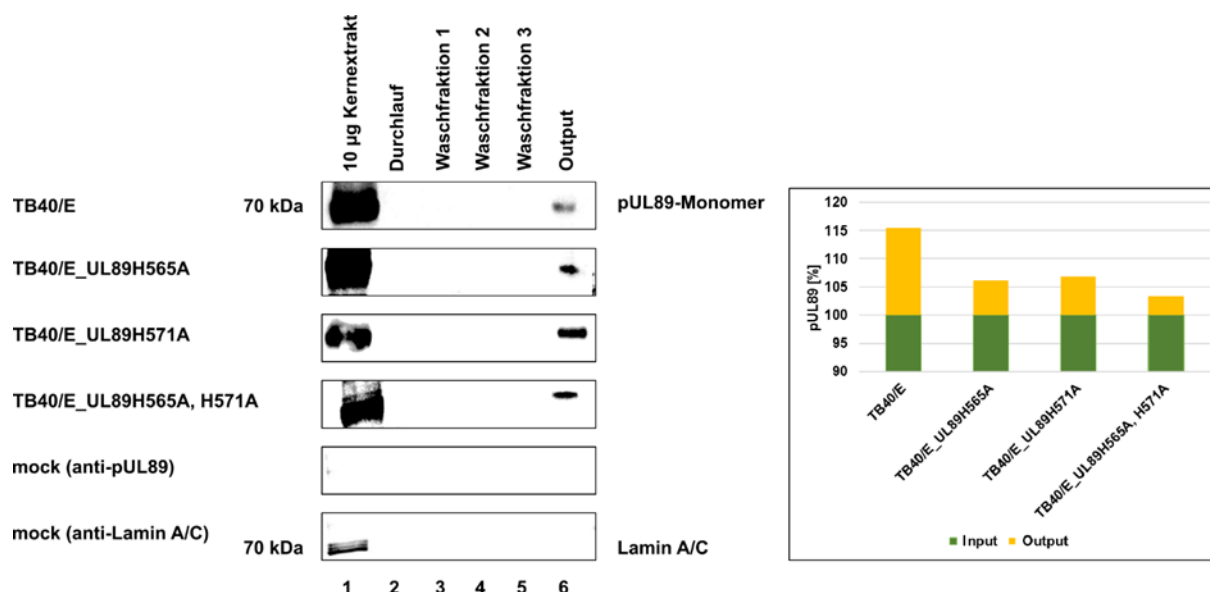
### 4.4.1.5 Nachweis der DNA-Bindungseigenschaften von Kernextrakten infizierter HELF Fi301-Zellen

Zur Bestätigung der *in vitro* DNA-Bindungsuntersuchungen der viralen Proteine (s. Seite 79-80) wurden *Pull-down*-Versuche mit Kernextrakten von infizierten HELF Fi301-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit TB40/E oder den Histidin-Virusmutanten infiziert und 96 h p.i. geerntet. Anschließend erfolgt die Extraktion der Kern- und Cytoplasma-Fraktion. Dazu wurden die abgelösten Zellen in CE-Puffer aufgenommen und auf Eis inkubiert. Nach Sedimentation wurde die cytoplasmatische Fraktion in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Zellkernfraktion mit CE Puffer ohne Detergenz gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Resuspension in NE Puffer und die Lyse der Kernmembran durch Zugabe von 5 M NaCl-Lösung. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte die Sedimentation der Fraktionen. Die Extrakte wurden mit Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt (s. Seite 54-55).



## Ergebnisse

Zur Durchführung der Untersuchung hinsichtlich der DNA-Bindungseigenschaften wurde pro Ansatz 100 µl Pierce™ Streptavidin Agarose Resin (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) für 2 h und 50 U/ min mit 1000 µl Puffer I äquiliert. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Streptavidin Agarose und die Kopplung von 500 ng Biotin-markierter DNA (Biotin-250bp-DNA, s Seite 58) für 30 min und 50 U/ min. Nach erfolgter Inkubation wurde die Streptavidin Agarose zweimal mit 100 µl Puffer I gewaschen und über Nacht mit 10 µg Kernextrakt von infizierten HELF Fi301 Zellen bei 4°C und 50 U/min inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Sedimentation sowie ein dreifacher Waschvorgang mit 100 µl Puffer I. Nach Zugabe von 15 µl 4x SDS-Probenpuffer erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 95°C. 20 µl des Überstandes wurden als Output für die Analyse verwendet. Zur Auswertung der *Pull-down*-Versuche wurden eine SDS-PAGE (s. Seite 55-56) und ein Western Blot (s. Seite 57-58) mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern α-pUL89 und α-Lamin A/ C durchgeführt. Eine Quantifizierung erfolgte mit dem Programm *CLIQS* (Totallab Ltd., Newcastle upon Tyne; Großbritannien).



**Abbildung 28: Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von Kernextrakten infizierte HELF Fi301-Zellen.** Kernextrakte von mit Wildtyp-Virus bzw. den Histidin-Virusmutanten infizierter HELF Fi301-Zellen (MOI = 1, 96 h p.i.) wurden für die *Pull-down*-Versuche zum Nachweis der DNA-Bindungseigenschaften verwendet. Nach Kopplung der Biotin-markierten DNA, erfolgte die Inkubation der Kernextrakte mit der Streptavidin Agarose über Nacht bei 4°C und 50 U/ min. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse. Spur eins zeigt 10 µg des verwendeten Kernextrakts der infizierten Zellen. Spur zwei zeigt den Durchlauf nach der Inkubation. Die Spuren drei bis fünf zeigen die Waschraktionen 1 bis 3. In Spur sechs ist der Output nach Versetzung mit SDS-Probenpuffer und Hitzebehandlung bei 95°C dargestellt. Die Quantifizierung wurde mit *CLIQS* (Totallab Ltd., Newcastle upon Tyne; Großbritannien) durchgeführt.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten *Pull-down*-Versuche. Kernextrakte infizierter HELF Fi301-Zellen, sowie nicht-infizierter Zellen (*mock*) wurden für

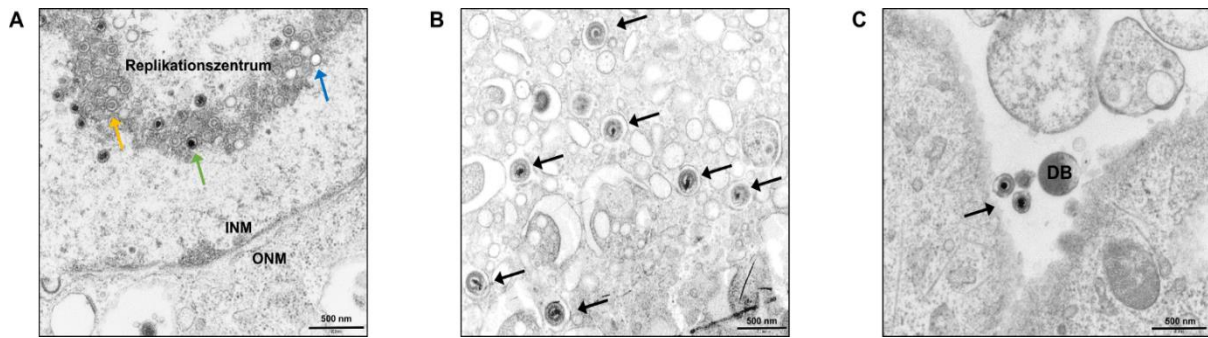
## Ergebnisse

diese Untersuchungen verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der Interaktion von pUL89 und der Biotin-markierten DNA (Biotin-250bp-DNA) ein stabiler Protein/ DNA-Komplex gebildet wird, da kein Protein im Durchlauf nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte auch kein pUL89 in den drei Waschfraktionen detektiert werden. Durch die Zugabe des 4x SDS-Probenpuffers und die Hitzebehandlung bei 95°C für 5 min konnte das gebundene pUL89 von der Streptavidin Agarose eluiert werden. Sowohl der Kernextrakt der mit TB40/E infizierten HELF Fi301-Zellen (Output TB40/E 15,4 %) als auch die Kernextrakte der Zellen, welche mit den Histidin-Virusmutanten (Output TB40/E\_UL89H565A 6,1 %, TB40/E\_UL89H571A 6,9 %, TB40/E\_UL89 H565A, H571A 3,3 %) infiziert wurden, zeigten eine definierte pUL89-Proteinbande als Output. Als Negativkontrolle wurden Kernextrakte nicht-infizierte HELF Fi301-Zellen verwendet, in denen keine DNA-Bindung durch pUL89 stattfindet. Als Ladekontrolle wurde bei diesem Ansatz Lamin A/C verwendet, welcher ein Marker für die Kernmembran ist. Dieser Antikörper ermöglichte die Detektion der Zellkernfraktion, durch eine Proteinbande bei ca. 70 kDa.

### **4.4.1.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtyp-Virus TB40/E und der Histidin-Virusmutanten**

Um den Einfluss der eingefügten Histidin-Mutationen auf die Struktur der Virionen zu untersuchen, wurden HELF Fi301-Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit dem Wildtyp-Virus TB40/E bzw. den Histidin-Virusmutanten (MOI = 3) infiziert und 96 h p.i. geerntet. Es folgte eine Fixierung in 20 mM HEPES (pH 7,4) mit 2,5 % Glutardialdehyd für 90 min und 50 U/min. Nach einer Nachfixierung mit 1 % Osmiumtetroxid wurden die Zellen für 1 h bei 50 U/ min mit 0,1 % Tannin kontrastiert. Nach erfolgter Dehydrierung wurden die Zellen mit 0,2 % Uranylacetat gefärbt, sowie eine Einbettung in Epon durchgeführt. Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mittels Ultramikrotom. Die angefertigten Schnitte wurden auf Kupfer-Netzchen übertragen und mit 1 % Uranylacetat sowie Bleicitrat gefärbt (s. Seite 62-63). Analysiert wurden die Ultradünnschnitte mit Hilfe eines FEI Elektronenmikroskop Tecnai G2 bei einer Spannung von 120 kV.

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Wildtyp-Virus TB40/E.** (A) Aufnahme des Nukleus mit innerer und äußerer Kernmembran (*inner and outer nuclear membrane*, INM and ONM). Markierung des viralen Replikationszentrums mit den drei Kapsid-Typen von HCMV. A-Kapsid (blauer Pfeil), B-Kapsid (gelber Pfeil) und C-Kapsid (grüner Pfeil). (B) Cytoplasmatische Aufnahme einer infizierten Zelle. Die schwarzen Pfeile markieren die infektiösen Virionen. (C) Extrazelluläre Aufnahme mit Virionen (schwarzer Pfeil), sowie ein dense body (DB).

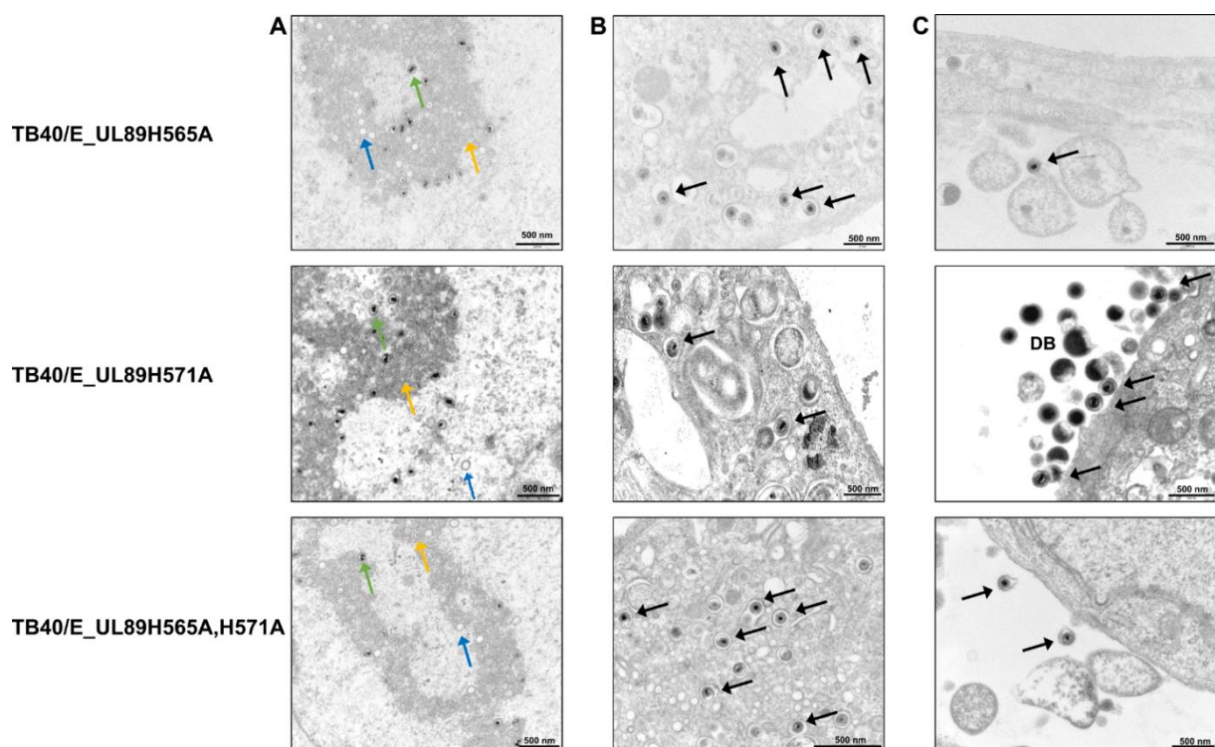
Abbildung 29 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von infizierten HELF Fi301-Zellen mit dem Wildtyp-Virus TB40/E (MOI = 1). Abbildung 29A zeigt die Aufnahme des Nukleus mit der inneren und äußeren Kernmembran (INM und ONM). Des Weiteren wurde das virale Replikationszentrum innerhalb des Nukleus gekennzeichnet. An diesem Ort kommt es zur Bildung und Reifung der viralen Kapside. Es wurden drei verschiedene Typen von Kapsiden detektiert. A-Kapside, welche mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet wurden, enthalten keine virale DNA. Die B-Kapside oder Prokapside sind durch einen gelben Pfeil gekennzeichnet und die reifen C-Kapside, welche die virale DNA enthalten, sind durch einen grünen Pfeil markiert. Abbildung 29B zeigt die cytoplasmatische Aufnahme der infizierten HELF Fi301-Zellen. Die infektiösen Virionen sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Abbildung 29C zeigt die Detektion von extrazellulären Virionen (schwarzer Pfeil) und einem *dense body* (DB).

Neben der Infektion mit dem Wildtyp-Virus TB40/E wurden ebenfalls elektronenmikroskopische Aufnahmen der rekombinanten Viren TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A durchgeführt. Abbildung 30 zeigt Aufnahmen von infizierten Zellen und den lokalisierten Kapsid-Formen (A-, B-, und C-Kapside) innerhalb der viralen Replikationszentren im Nukleus (Abb. 30A), sowie Aufnahmen der Virionen im Cytoplasma (Abb. 30B) und im extrazellulären Bereich (Abb. 30C) der Zellen.

Ebenso wie bei der Infektion mit dem Wildtyp-Virus TB40/E konnten in den Replikationszentren im Nukleus der mit den Histidin-Virusmutanten infizierten Zellen die drei Kapsid-Formen bestehend aus dem A-Kapsid (blauer Pfeil), B-Kapsid (gelber Pfeil)

## Ergebnisse

und C-Kapsid (grüner Pfeil) nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Virus TB40/E und der Mutante TB40/E\_UL89H571A konnten bei den beiden Mutanten TB40/E\_UL89H565A und TB40/E\_UL89H565A, H571A eine geringere Anzahl von C-Kapsiden beobachtet werden. Aus dieser Art der Kapside entstehen im Infektionsverlauf die infektiösen Virionen (s. Abb. 29B und 30B). Ergänzend zu dieser Beobachtung konnten bei den beiden Mutanten TB40/E\_UL89H565A und TB40/E\_UL89H565A, H571A keine *dense bodies* detektiert werden (s. Abb. 30C). Diese Akkumulation von Tegument- und Hüllproteine, dessen Funktion bisher unbekannt ist, ist charakteristisch für die Infektion mit HCMV.



**Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Histidin-Virusmutanten TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A. (A)** Aufnahmen der Nukleus-Region der infizierten Zelle mit den drei Kapsid-Typen A-Kapsid (blauer Pfeil), B-Kapsid (gelber Pfeil) und C-Kapsid (grüner Pfeil). **(B)** Abbildung der Cytoplasma-Region der infizierten Zelle, infektiöse Virionen sind mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. **(C)** Aufnahme der extrazellulären Region mit freigesetzten Virionen (schwarzer Pfeil) und *dense bodies* (DB).

### 4.4.2 Rekonstitution der wachstums-defiziten BAC-Mutanten

**TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A**

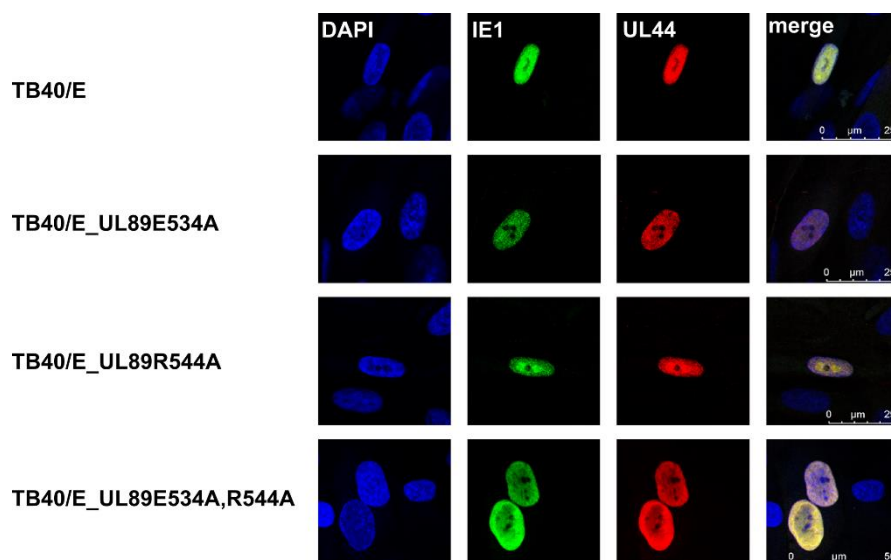
Eine Rekonstitution der BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A war in HELF Fi301-Zellen nicht möglich. Die Genom-Integrität wurde mit Hilfe einer NGS-Analyse (s. Seite 37) dieser Mutanten bestätigt

## Ergebnisse

(s. Seite 81 Abb. 21). Außer den eingefügten Punktmutationen (E534A, R544A) in *UL89* konnten in den gesamten BACs keine weiteren Mutationen festgestellt werden. Für eine weitere Untersuchung des Rekonstitutionsdefekts wurde zunächst die virale Proteinexpression durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Im Anschluss wurden Versuche zur Rekonstitution mit komplementären Zelllinien durchgeführt.

### 4.4.2.1 Nachweis der viralen Proteinexpression in den wachstums-defiziten BAC-Mutanten mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz

Die BAC-Mutanten TB40/E-UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A konnten nicht in HELF Fi301-Zellen rekonstituiert werden, sodass die Herstellung von Virusstocks nicht möglich war. Zur Überprüfung der viralen Genexpression wurde eine Transfektion der BAC-Mutanten in HELF Fi301-Zellen durchgeführt (s. Seite 45-46) und die transfizierten Zellen anschließend auf 24 *well*-Zellkulturplatten, welche im Vorhinein mit Deckgläschen versehen wurden, ausgesät. Nach siebentägiger Inkubation wurden die Zellen mit 4% PFA für 20 min bei RT fixiert und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt (s. Seite 50).



**Abbildung 31: Nachweis der viralen Proteinexpression in den wachstums-defiziten BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A.** Als Kontrolle wurde auch die Transfektion des Wildtyp-BAC TB40/E mitgeführt. Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde 7 d p.t. durchgeführt gegen die viralen Proteine IE1 und pUL44. Des Weiteren wurden die Nuklei mit DAPI angefärbt. Das *merge*-Bild zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

Es wurden die zwei HCMV-spezifischen Antikörper  $\alpha$ -IE1 und  $\alpha$ -pUL44 für den Nachweis der viralen Genexpression verwendet. Nach Durchführung der

## Ergebnisse

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Deckgläschen mit einer Fluomount-G/DAPI-Lösung auf einem Objektträger fixiert. Am darauffolgenden Tag erfolgten die finale Fixierung mit durchsichtigen Nagellack sowie die Aufbewahrung der Objektträger im Dunkeln.

In Abbildung 31 ist die Kontrolle des Transfektionserfolges mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung der viralen Proteinen IE1 und pUL44 dargestellt. Ebenso wie beim Wildtyp-BAC war die Detektion der spezifischen Proteine IE1 und pUL44 in den Ansätzen der wachstums-defiziten BAC-Mutanten möglich, dass *merge*-Bild zeigt die Überlagerungen der einzelnen Färbungen. Jedoch konnte keine CPE-Bildung in den Mutanten detektiert werden.

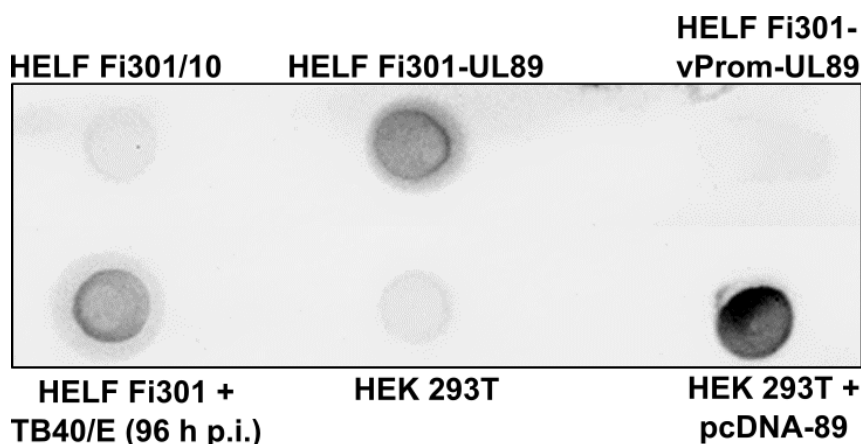
### 4.4.2.2 Klonierung einer komplementierenden Zelllinie zur Rekonstitution der wachstums-defiziten BAC-Mutanten

Während das Wildtyp-BAC und die Histidin-Mutanten erfolgreich transfiziert werden konnten und eine eindeutige Virusausbildung und –vermehrung zeigten, konnte in den BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A keine CPE-Ausbildung nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte der Nachweis, dass nach einer Transfektion dieser BACs eine Expression von viralen Proteinen in den HELF Fi301-Zellen auftritt. Zur Rekonstitution dieser rekombinanten BACs sollten Zelllinien verwendet werden, welche stabil pUL89 bzw. pUL89 mit dem natürlichen Promotor exprimieren. Die Verwendung solcher Zelllinien stellt eine etablierte Methode dar, um essentielle Mutationen in rekombinanten Viren zu komplementieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Zelllinien für eine mögliche Komplementierung der essenziellen Mutationen getestet. Zu Beginn wurde eine Überprüfung der pUL89-Proteinexpression in diesen Zelllinien durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse dieser Überprüfung mit Hilfe einer Western Blot-Analyse. Die verschiedenen Zelllinien wurden geerntet, mit PBS gewaschen und sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment in RIPA-Puffer aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und bei 15.300 x g für 30 min und 4°C sedimentiert (s. Seite 54). Nach erfolgter BCA-Proteinbestimmung (s. Seite 52), wurden 5 µg der Zellextrakte für den Proteinnachweis verwendet. Neben HELF Fi301- und HEK-293T-Zellen wurden die

## Ergebnisse

beiden Zelllinien HELF Fi301-UL89 und HELF Fi301-vProm-UL89 getestet. Als Kontrollen wurden TB40/E infizierte HELF Fi301- (MOI = 1, 96 h p.i.), sowie mit pcDNA-89 transient-transfizierte HEK-293T-Zellen für den Proteinnachweis verwendet. Die beiden als Negativkontrolle verwendeten Zelllinien HELF Fi301 und HEK-293T zeigten keine pUL89-Expression im Zellextrakt. Im Vergleich dazu konnte in den infizierten HELF Fi301-Zellen und in den transfizierten HEK-293T-Zellen eindeutig das virale Protein pUL89 nachgewiesen werden.



**Abbildung 32: Nachweis der pUL89-Expression in verschiedenen Zelllinien.** Dargestellt sind 5 µg der Zellextrakte von HELF Fi301-, HELF Fi301-UL89-, HELF Fi301-vProm-UL89-, TB40/E infizierte HELF Fi301- (96 h p.i.), HEK-293- und mit pcDNA-89 transfizierte HEK-293T-Zellen. Der Nachweis der pUL89-Expression erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper α-pUL89.

Zunächst wurde eine Zelllinie getestet, welche stabil das Wildtyp-Protein pUL89 exprimiert (HELF Fi301-UL89). Diese wurde freundlicherweise von Dr. Lüder Wiebusch (Pädiatrische Molekularbiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt. Abbildung 32 zeigt, dass bei dieser Zelllinie eindeutig eine pUL89-Expression nachgewiesen werden konnte. Der ORF *UL89* liegt unter der Kontrolle des CMV-IE1-Promotors vor, wodurch eine hohe Proteinexpression erreicht wird. Jedoch führte die Verwendung dieser Zelllinie ebenfalls nicht zur erfolgreichen Rekonstitution der BAC-Mutanten. Wie bei der Zelllinie HELF Fi301 konnte keine CPE-Ausbildung nach der Transfektion der BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A detektiert werden.

Aufgrund früherer Erfahrungen in der Rekonstitution einer Ex2-UL89-Deletionsmutante<sup>61</sup>, welche für eine erfolgreiche Ausbildung eines CPE neben der Kotransfektion des Wildtyp-Proteins pUL89 auch den dazugehörigen, viralen Promotor benötigte,

## Ergebnisse

sollte eine zweite Zelllinie generiert und getestet werden. (s. Seite 38-42). Diese Zelllinie, HELF Fi301-vProm-UL89, welche stabil pUL89 unter der Kontrolle des natürlichen viralen Promotors dieses Proteins exprimiert, wurde für die Durchführung der Rekonstitution der wachstums-defiziten BAC-Mutanten verwendet. Im Proteinnachweis (s. Abb. 32) zeigte sich, dass keine pUL89-Expression nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Möglichkeit, dass der Promotor durch andere virale Proteine während einer Infektion reguliert und damit aktiviert wird, wurde trotz fehlendem Proteinnachweis ein Rekonstitutionsversuch vorgenommen. Ebenso wie bei der Verwendung der Zelllinien HELF Fi301 und HELF Fi301-UL89 konnte allerdings keine CPE-Ausbildung der rekombinanten BAC-Mutanten nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde auch das Wildtyp-BAC transfiziert, welches in den HELF Fi301-vProm-UL89 eindeutig nach ca. 10 Tagen einen CPE ausbildete. Es war nicht möglich die essenziellen Mutationen in den BACs zu komplementieren und rekombinanten Viren zu generieren.



### 5. Diskussion

Das humane Cytomegalievirus gehört zur Familie der *Herpesviridae* und ist einer von neun humanpathogenen Vertretern dieser Familie<sup>1</sup>. Klinisch relevant ist die Infektion von immunsupprimierten Patienten, sowie die *in utero* Übertragung des Virus von der Mutter auf das ungeborene Kind<sup>6-9</sup>. Aufgrund der Toxizität, geringen Bioverfügbarkeit und Resistenzausbildung gegen die bestehenden Therapeutika ist eine Identifikation von virus-spezifischen Angriffspunkten von hoher Relevanz.

Der DNA-Verpackungsmechanismus durch einen Terminase-Komplex wurde erstmals in der Ordnung *Caudovirales* beschrieben. Diese Viren, welche ebenfalls ein großes DNA-Genom besitzen, weisen *pac*- oder *cos*-Erkennungssequenzen innerhalb des Genoms auf<sup>99</sup> und nutzen als Wirte Bakterien oder Archeen. Die Ähnlichkeiten im DNA-Verpackungsmechanismus und der Kapsidstruktur von *Herpesviridae* und *Caudovirales* beruht auf einem gemeinsamen Vorfahren<sup>46</sup>.

Die virale DNA-Verpackung in *Herpesviridae* und *Caudovirales* wird durch einen hetero-oligomeren Proteinkomplex, der Terminase, vermittelt und liegt konserviert in diesen Viren vor. Dieser Vorgang hängt von einer Vielzahl von viralen Proteinen ab, so konnten in HCMV die sieben Genprodukte UL104, UL93, UL89, UL77, UL56, UL52 und UL51 als essenziell identifiziert werden<sup>48</sup>. Der Ablauf einer vollständigen und fehlerfreien DNA-Verpackung ist ausschlaggebend für die Bildung neuer Virionen und der Ausbreitung der viralen Infektion. Der Vorgang der DNA-Verpackung beinhaltet die Genomreplikation und Bindung der Terminase-Untereinheit pUL56 an die *pac*-Sequenzen, welche konserviert in den *a*-Sequenzen innerhalb des HCMV-Genoms lokalisiert sind. Nach erfolgter Assoziierung der Untereinheit pUL89 an den pUL56-DNA-Komplex, findet die Spaltung der konkatemeren DNA statt. Es folgt die Interaktion mit dem Portalprotein pUL104, sowie die Translokation des DNA-Genoms in ein vorgebildetes Prokapsid. Nach anschließender DNA-Verpackung und enzymatischer Spaltung des *Scaffolds*, entstehen aus ihnen die ikosaedrischen C-Kapside. Aus dieser Kapsidform werden im weiteren Verlauf infektiöse Virionen gebildet<sup>29,47,100</sup>. Die Aufklärung der DNA-Verpackung in HCMV ist schon längere Zeit ein Ziel intensiver wissenschaftlicher Studien. Jedoch ist bisher wenig über die genaue Rolle der Nuklease pUL89 innerhalb des Terminase-Komplexes bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass pUL89 die Fähigkeit zur Bindung und Spaltung von dsDNA besitzt<sup>55,62</sup>.

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollen funktionelle Domänen, sowie essenzielle Aminosäuren innerhalb pUL89 identifiziert und charakterisiert werden. In früheren Untersuchungen konnte bereits eine Interaktions-Domäne mit der zweiten Terminase-Untereinheit pUL56 identifiziert werden, welche die Aminosäuren 580-600 umfasst (GRDKALAVEQFISRFNSGYIK)<sup>61</sup>. Mit Hilfe von *in silico*-Analysen und der Konstruktion von Proteinaustausch-Mutanten soll pUL89 hinsichtlich einer DNA-Bindedomäne, sowie einer Nuklease-Domäne untersucht werden. Ein erster Anhaltspunkt der Nuklease-Domäne liefert eine Publikation von Nadal et al.<sup>68</sup>, in der die essenzielle Funktion der Aminosäuren D463, E534 und D651 in einem C-terminalen Konstrukt von pUL89 nachgewiesen werden konnte. Nach erfolgreicher Identifikation sollen rekombinante Viren erstellt und die Funktion der Aminosäuren tiefergehend charakterisiert werden.

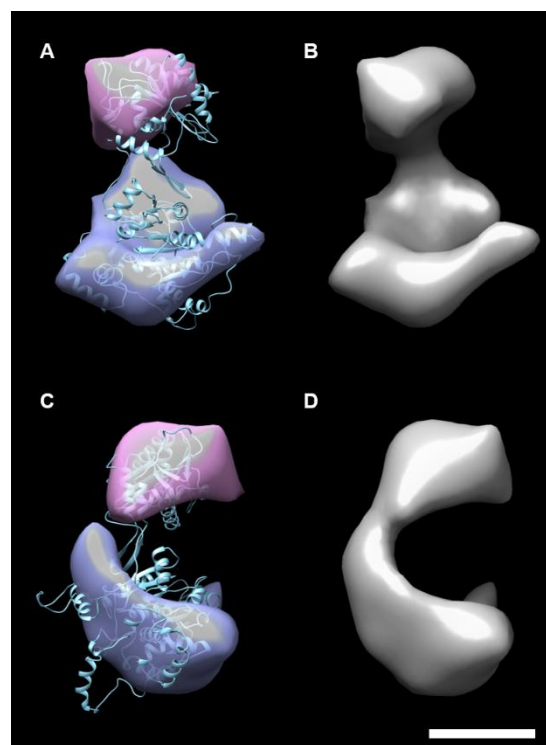
### 5.1 Struktur von pUL89

Bei der Nuklease pUL89 handelt es sich um ein ca. 75 kDa großes Protein, welches in der Proteinreinigung den Nachweis zweier Proteinbanden bei ca. 70 und 130 kDa ermöglicht (s. Abb. 16). Diese konnten durch einen monospezifischen Antikörper als Monomer und Homodimer von pUL89 identifiziert werden (s. Abb. 15). Dadurch zeigt sich, dass pUL89 zur Dimerisierung neigt. Dieses Dimer stellt einen stabilen Komplex zwischen den beiden pUL89-Monomeren dar, der auch durch eine 95°C-Behandlung und der Zugabe von 50 mM DTT nicht getrennt werden kann.

Zur Identifizierung von funktionellen Domänen und essenziellen Aminosäuren wird eine Strukturanalyse von pUL89 durchgeführt. Die Toxizität dieses Proteins in *E. coli*, als auch eine ungenügende Proteinexpression in humanen Zellen, ermöglicht keine Kristallstrukturanalyse. Basierend auf dieser Tatsache wird eine *in silico* Strukturanalyse mit dem Programm *Phyre2* durchgeführt. Bioinformatische Strukturvorhersagen beruhen darauf, dass die Struktur von Proteinen stärker konserviert ist als die Aminosäuresequenz. Ergänzend gibt es Hinweise darauf, dass nur eine definierte Anzahl von einzigartigen Proteinfaltungen in der Natur auftreten (1000-10.000)<sup>90</sup>, sodass diese Programme eine verlässliche Struktur-Vorhersage ermöglichen. Abbildung 12 zeigt das ermittelte Tertiärstruktur-Modell von pUL89, sowie die Kristallstrukturen der homologen Proteine gp17 (T7 Bakteriophage, PDB: 3EZK\_B), TerL (thermophilen Tiefsee Phagen D6E, PDB: 5OE9\_C) und der 279 AA langen Nuklease-Domäne von

## Diskussion

pUL89 (PDB: 3N4P). Diese drei Proteine zeigen die höchste Übereinstimmung mit dem Gesamtprotein pUL89. Mit Hilfe dieser Analyse kann gezeigt werden, dass pUL89 aus einer N- und C-terminalen Proteindomäne besteht. Diese Domänen sind über eine flexible Region, die als *hinge*-Region bezeichnet wird, verbunden. Diese Proteinorganisation wurde auch mit Hilfe einer Einzelpartikel-Analyse von Baculovirus-exprimierten Protein nachgewiesen. Durch elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die Struktur von pUL89 mit einer Auflösung von 3 nm dargestellt werden<sup>98</sup>. Abbildung 33 zeigt die 3D-Rekonstitution von pUL89 mit Hilfe der Einzelpartikel-Analyse.



**Abbildung 33: 3D-Rekonstitution der Struktur von pUL89 durch Einzelpartikel-Analyse.** (A, B) Oberflächen-Präsentation von pUL89 3D-Rekonstitution in der Frontansicht. (C; D) Präsentation in der Seitenansicht. Präsentation mit (A, C) bzw. ohne (B, D) der vorhergesagten Tertiärstruktur von pUL89. Der Maßstab entspricht 5 nm. Das Magenta-gefärbte Segment entspricht der C-terminalen Domäne, während das blaue Segment die N-terminalen Domäne repräsentiert (entnommen aus: Theiß et al., 2019<sup>98</sup>).

Ähnliche Tertiärstrukturen konnten bei homologen Proteinen der Bakteriophagen T7<sup>101</sup>, D6E<sup>102</sup>, Sf6, P74-26 und phi29 beobachtet werden<sup>103,104</sup>. Diese Proteinorganisation tritt somit in einer Vielzahl von Terminase-Untereinheiten auf und konnte kürzlich auch für das HSV-1 Homolog pUL15 nachgewiesen werden<sup>105</sup>.

## Diskussion

Während die Proteine von dsDNA-Bakteriophagen eine Kristallstrukturanalyse ermöglichen, treten bei Herpesviren wie oben beschrieben Schwierigkeiten hinsichtlich dieser Methode auf. Durch die Kristallisierung und Röntgenstrukturanalysen von einzelnen, konservierten Domänen dieser Proteine konnten diese Probleme zum Teil überwunden werden. So konnten Nadal et al.<sup>68</sup> die C-terminale Domäne von pUL89 kristallisieren, während Sigamani et al.<sup>69</sup> eine Kristallstruktur der C-terminalen Domäne des homologen Proteins pUL15 aus HSV-1 generieren konnten. Beide Domänen weisen eine RNase H Faltung auf, welche typisch für Enzyme ist, die RNA in DNA-RNA-Hybride, abbauen. Die Faltung liegt hoch konserviert vor und besteht aus fünf  $\beta$ -Faltblättern, welche von  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Das zweite Faltblatt liegt antiparallel zu den restlichen vier  $\beta$ -Faltblättern vor<sup>106</sup>. Die RNase H Faltung konnte, aus evolutionärer Sicht betrachtet, als eine der ältesten Proteinfaltungen<sup>107</sup> identifiziert werden. Sie tritt in vielen Enzymen, welche am Nukleinsäure-Metabolismus beteiligt sind, auf. Dazu zählen die retrovirale Integrase, DNA-Transposons<sup>108</sup>, Holliday-Junction Resolvasen (HJR)<sup>109</sup>, Piwi/ Argonaut-Nuklease<sup>110,111</sup>, eine Vielzahl von Exonuklease<sup>112</sup> als auch Prp8<sup>113</sup>, ein splicosomales Protein.

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die Terminase-Untereinheiten oligomerisieren und hetero-oligomere Proteinkomplexe bilden. So setzt sich die Terminase des Bakteriophagen  $\lambda$  aus einem Tetramer zusammen, die Untereinheiten weisen eine Stöchiometrie von [gpAP1/ gpNu1(2)]<sub>4</sub> auf<sup>114,115</sup>. Im Bakteriophagen T4 konnte nachgewiesen werden, dass die kleine Untereinheit gp16 oligomerisiert und Oktamere bildet<sup>116</sup>. Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien zu *Lactococcus* Bakteriophage, *Geobacillus stearothermophilus* Bakteriophage D6E und Bakteriophage G20C gezeigt werden<sup>102,117,118</sup>. Auch die Terminase von HCMV, bestehend auf pUL56 und pUL89, bildet einen hetero-oligomeren Proteinkomplex aus Penta- und Hexameren<sup>119</sup>. Die Bindung von pUL89 und pUL56 wird dabei über zwei Interaktionsdomänen in den Proteinen vermittelt. Die Interaktionsdomäne von pUL89 befindet sich im Bereich der Aminosäuren AA 580-600 (GRDKALAVEQFISRFNSGYIK), während WMVVKYMGGFF (AA 671-680) in pUL56 die Bindung vermittelt<sup>61,66</sup>. Inwieweit pUL51 die Stöchiometrie dieses Proteinkomplexes verändert ist bisher noch unbekannt. PUL51 ist ein 157 AA langes Protein, welches vor kurzem als dritte Proteinspezies im Terminase-Komplex von HCMV nachgewiesen werden konnte. Der C-Terminus von pUL51 interagiert mit pUL89 und pUL56 und beeinflusst somit die Assemblierung der Terminase<sup>120,121</sup>. In

## Diskussion

einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte durch Cryo-Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass der Terminasekomplex von HSV-1, bestehend aus pUL15, pUL28 und pUL33, ein Hexamer als aktive Form bildet<sup>105</sup>.

### 5.2 *In vitro* Identifizierung funktioneller Domänen

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss potenziell funktioneller Aminosäuren auf die Nuklease- und DNA-Bindungsaktivität des Gesamtproteins untersucht werden. Dazu werden Proteinaustausch-Mutanten mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese generiert, in HEK-293T-Zellen transient exprimiert und gereinigt. Als Expressionsvektor wird pc-DNA3.1/ His<sup>®</sup> B verwendet, welcher das Protein mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert. Aufgrund dieser Histidin-Sequenz wird eine Aufreinigung über eine immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht. Diese Methode, welche erstmal 1975<sup>122</sup> beschrieben wurde, ermöglicht eine spezifische Bindung und Reinigung des gewünschten Proteins. Die sechs Histidin-Aminosäuren interagieren über ihre Imidazol-Ringe mit den, auf den verwendeten Säulen, immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen, wodurch ein sehr stabiler Chelat-Komplex entsteht, welcher eine spezifische Bindung des Proteins ermöglicht. Anschließend werden die Säulen gewaschen und das Protein durch die Zugabe eines Überschusses an Imidazol eluiert, welches den Histidin/ Ni<sup>2+</sup>-Ionen-Komplex trennt und den Platz der Histidine einnimmt.<sup>123</sup>. Das gewünschte Protein befindet sich anschließend in der Elutionsfraktion und kann für weitere Versuche eingesetzt werden.

#### 5.2.1 Nuklease-Domäne von pUL89

Zur Identifizierung der Nuklease-Domäne wurden Ergebnisse aus der Publikation von Nadal et al.<sup>68</sup> in die Analyse des Gesamtproteins miteinbezogen. In der Studie aus dem Jahr 2010 konnten D463, E534 und D651 als essenzielle Aminosäuren für den C-Terminus von pUL89 (279 AA) identifiziert werden. Während die AA D463 und E534 Teil eines der  $\beta$ -Faltblätter der RNase H Faltung sind, ist D651 innerhalb einer der umgebenden  $\alpha$ -Helices lokalisiert. Nach erfolgter Klonierung, Transfektion und Reinigung des Gesamtproteins wurde eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Bradford-Assays<sup>80</sup> durchgeführt. Anschließend konnten das Wildtyp-Protein pUL89 bzw. die Proteinaustausch-Mutanten (pUL89-sub) für die Nuklease-Untersuchungen eingesetzt werden.

## Diskussion

Bereits in einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass pUL89 eine Nuklease-Aktivität aufweist. Diese Aktivität wird durch die Interaktion mit pUL56 verstärkt und erfolgt sequenz-unabhängig<sup>55</sup>. Die Nuklease-Aktivität von Terminase-Untereinheiten konnte bereits in einer Vielzahl homologer Proteine wie zum Beispiel aus HSV-1 (pUL15)<sup>69</sup> oder aus den Bakteriophagen G20c<sup>124</sup> oder gp2<sup>125</sup> nachgewiesen werden. Aber auch die bereits erwähnten Proteine gp17<sup>101</sup> (T7 Bakteriophagen) und TerL<sup>102</sup> (D6E) weisen neben einer ATPase-Aktivität eine Nuklease-Funktion auf. Mit Hilfe dieser Funktion, welche die Terminase zur Spaltung der gebildeten konkatemeren DNA befähigt, wird eine virale Genomeinheit in ein neusynthetisiertes Prokapsid verpackt. Die Nuklease-Funktion erfüllt damit eine essenzielle Aufgabe im DNA-Verpackungsmechanismus dieser Viren.

In der vorliegenden Arbeit soll die Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89 aus HCMV durch Untersuchungen zur Spaltung von zirkulärer DNA (s. Abb. 17A) und linearer DNA (S. Abb. 17B) charakterisiert werden. Diese beiden Untersuchungen zeigen, dass eine höhere Proteinkonzentration für die Spaltung von linearer DNA als für die Spaltung zirkulärer DNA benötigt wird. Während für den Abbau des intakten Plasmids bereits eine Proteinkonzentration von 0,4  $\mu\text{M}$  (Abb. 17A, Spur 6) ausreichend ist, wird bei linearen DNA die höchste Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  für ein ähnliches Ergebnis benötigt (Abb. 17B, Spur 11). Diese verschiedenen Proteinkonzentrationen deuten auf eine unterschiedliche Spezifität hinsichtlich des DNA-Substrates hin. PUL89 weist eine größere Affinität zu zirkulärer dsDNA auf.

Des Weiteren soll die Hemmung der Nuklease-Aktivität des Wildtyp-Proteins pUL89 durch den Terminase-Inhibitor BDCRB untersucht werden (s. Abb. 18A). Dieser Inhibitor gehört zu einer Klasse von Benzimidazol Ribonukleosiden, welche HCMV während eines späten Zeitpunktes im Replikationszyklus hemmen, ohne die DNA-Replikation zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass BDCRB die ATPase Aktivität von pUL56 inhibiert und der Einsatz höherer Konzentrationen zu einer partiellen Inhibierung der Nuklease pUL89 führt<sup>126</sup>. Wie bei einer Vielzahl der eingesetzten Virosatika gegen HCMV konnten auch bei BDCRB Mutationen im viralen Genom mit der Resistenzentwicklung in Verbindung gebracht werden. So führt die Mutation von D344 zu E344 in *UL89* zu einer geringfügigen Resistenz des Virus gegen BDCRB, während die Mutationen D344 zu E344 und A355 zu T355 in *UL89* eine hohe Resistenzausbildung bedingen. Des Weiteren wurde die Mutation von Q204 zu R204 als

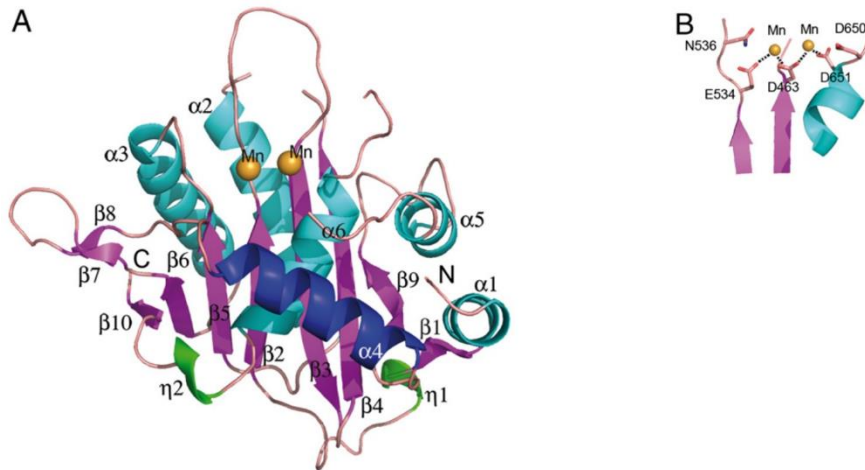
## Diskussion

Resistenzmarker in *UL56* identifiziert<sup>127,128</sup>. Mit zunehmender BDCRB-Konzentration konnte gezeigt werden, dass die Nuklease-Aktivität von pUL89 *in vitro* inhibiert werden kann. Ohne die Zugabe des Inhibitors liegt der lineare Anteil der DNA bei ca. 43 % (Spur drei). Durch den Einsatz von 5  $\mu$ M BDCRB ist eine Detektion dieses Spaltungsprodukts nicht mehr möglich (Spur sechs). Ergänzend kann gezeigt werden, dass der Anteil der cccDNA mit steigender BDCRB-Konzentration zunimmt. Die beobachtete Nuklease-Aktivität des gereinigten pUL89 kann spezifisch durch den Terminase-Inhibitor BDCRB blockiert werden.

Zur Validierung der Nuklease-Untersuchungen wird dieser Versuch mit dem N-Protein des Hantavirus (Sangassou) ebenfalls durchgeführt. Bei diesem Protein konnte bisher keine Nuklease Aktivität nachgewiesen werden. Abbildung 18B zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen. Während 0,5  $\mu$ M pUL89 eine eindeutige Spaltungs-Aktivität zeigt, welche durch die Zugabe des Inhibitors blockiert werden kann (s. Abb. 18B, Spuren drei und vier), kann bei 0,5  $\mu$ M N Protein keine Nuklease-Aktivität detektiert werden (s. Abb. 18B, Spuren fünf und sechs). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Behandlung und die temperaturabhängige Inkubation einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung der Spaltungsprodukte haben.

Abschließend wird die Nuklease-Aktivität der Proteinaustausch-Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Protein untersucht (s. Abb. 19). Neben den vermuteten Nuklease-Aminosäuren werden auch die ausgewählten DNA-Bindungs-Mutanten charakterisiert, um einen Einfluss der Punktmutationen auf diese Funktion auszuschließen. Nach der Inkubation mit 0,5  $\mu$ M pUL89 (Spur drei) konnte ein Anteil an cccDNA von 3,5 % sowie 65 % lineare DNA festgestellt werden. Eine ähnliche Effizienz zeigen die Mutanten E534A (Spur fünf, 4 % cccDNA, 62 % lin) und R544A (Spur sechs, 2,5 % cccDNA, 29 % lin). H565A (Spur sieben, 17 % cccDNA, 45 % lin), H571A (Spur acht, 9 % cccDNA, 30 % lin) und D651A (Spur neun, 10 % cccDNA, 42 % lin) weisen hingegen eine geringfügige Reduktion der Nuklease-Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein auf. Einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Spaltung hat die Mutation D463A (Spur vier), in der 43 % cccDNA detektiert werden konnte. Bei dieser Mutation liegt der Anteil der linearen DNA bei ca. 15 %.

## Diskussion



**Abbildung 34: Ribbon-Model der Struktur und Koordinierung der zweiwertigen Kationen in der Nuklease-Domäne pUL89-C. (A)** Ribbon-Model der Kristallstruktur. Die  $\beta$ -Faltblätter sind in Magenta dargestellt, während die  $\alpha$ -helices in Türkis/Blau dargestellt sind. Mangan (Mn) ist symbolisch durch zwei gelbe Kugeln dargestellt. **(B)** Koordinierung der Metallionen durch die Aminosäuren D463, E534 und D651 (modifiziert nach Nadal et al.<sup>68</sup>).

Nadal et al.<sup>68</sup> konnten durch eine Kristallstrukturanalyse der C-terminalen Nuklease-Domäne feststellen, dass die drei Aminosäuren D463, E534, D651 an der Koordinierung der für die Spaltung benötigten zweiwertigen Kationen beteiligt sind (s. Abb.34B). Abbildung 34 zeigt die Kristallstruktur der Nuklease-Domäne (pUL89-C) aus der Publikation von Nadal et al.<sup>68</sup>. Die charakteristische Faltung der RNase H-Familie ist auch in diesem C-terminalen Proteinkonstrukt erhalten geblieben. In der Publikation wurde Mangan (Mn, gelbe Kugel) als zweiwertiges Kation verwendet. Es zeigte sich, dass E534 und D463 ein  $Mn^{2+}$ -Ion koordinieren, während das andere durch D463 und D651 gebunden wird.

In dieser Studie kann lediglich der Einfluss der Mutation D463A im Gesamtprotein nachgewiesen werden. Während E534A im Gesamtprotein keinen Effekt zeigt, führt die Mutation D651A lediglich zu einer geringen Reduktion der Aktivität. Die Aminosäure D463 kann somit als essenzielle Aminosäure für die Nuklease-Aktivität des Gesamtproteins pUL89 bestätigt werden. Es war bereits möglich auch in anderen viralen Nuklease-Proteinen essenzielle Aminosäuren zu identifizieren. So nimmt K428 in gp2C des Bakteriophagen Sf6 eine wichtige Rolle innerhalb der Metallionen-Bindung ein<sup>125</sup>. Ebenso konnte D255<sup>129</sup> in gp17 (T7 Bakteriophage), sowie D509, E581 und D707<sup>69</sup> in der Nuklease-Domäne von pUL15 (pUL15-C, HSV-1) als essenziell für die Aktivität dieser Proteine identifiziert werden. Eine Analyse der Tertiärstruktur des Gesamtproteins (s. Abb. 12) offenbart eine Vielzahl anderer möglicher deprotonierter



## Diskussion

Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zu D463. Dazu zählen E493, E505, E510, D650 und D665. Eine nähere proteinbiochemische Untersuchung dieser möglichen Interaktionspartner könnte weitere essenzielle Aminosäuren im Gesamtprotein offenbaren.

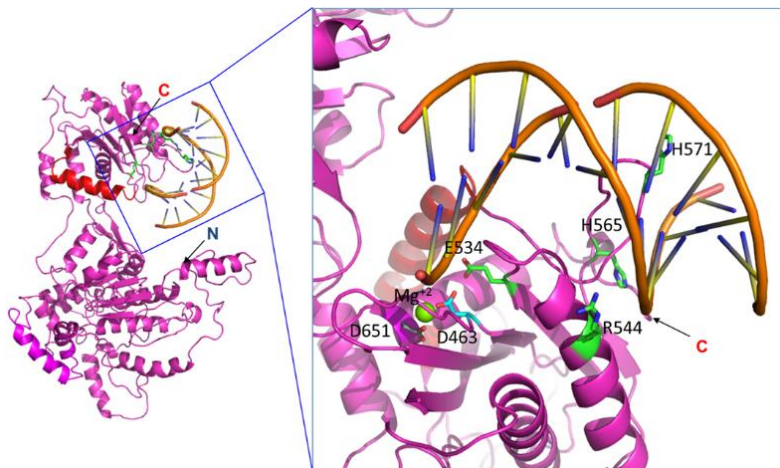
### 5.2.2 DNA-Bindedomäne von pUL89

Zur Identifizierung der DNA-Bindedomäne von pUL89 wird zunächst eine ausführliche *in silico* Analyse durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an vorhergesagten DNA-bindenden Regionen (DBR 1-9) wird nach bekannten DNA-bindenden Motiven wie HTH-Motiven<sup>94</sup> und Zink-Finger-Domänen<sup>93</sup> gesucht. Es können jedoch keine Zink-Finger-Domänen innerhalb pUL89 festgestellt werden. Durch die *in silico* Programme *GYM 2.0*<sup>87</sup> und *Helix-Turn-Helix Motif Prediction*<sup>88</sup> können drei potenzielle HTH-Motive identifiziert werden, welche jedoch keine Signifikanz aufweisen. Das erste liegt im Bereich der Aminosäuren 103 bis 138 (HTH-1), das zweite im Bereich AA 487-507 (HTH-2), während das dritte im Bereich der AA 236-261 (HTH-3) lokalisiert werden konnte. Eine Sekundärstrukturanalyse mit *PSIPRED*<sup>89</sup> der pUL89-Primärstruktur ergibt, dass nur der Bereich des potenziellen HTH-1 die typische Domänenorganisation bestehend aus *Helix-Turn-Helix* aufweist (s. Abb. 11A). Allerdings kann *DP-Bind*<sup>85</sup> in diesem Bereich keine potenziell DNA-bindenden Aminosäuren identifizieren. Aufgrund der vorhergesagten Struktur durch *Phyre2*<sup>90</sup>, der Oberflächenladung und der Annahme, dass Nuklease und DNA-Bindung in räumlicher Nähe durch pUL89 vermittelt werden, werden Aminosäuren im Bereich der RNase H-Faltung zur Analyse ihrer DNA-bindenden Eigenschaften ausgewählt. Es wurden die drei Aminosäuren R544, H565 und H571 für die *in vitro* DNA-Bindungsuntersuchungen herangezogen. Ein zunächst durchgeführter Sequenzvergleich mit homologen Proteinen aus RCMV, HSV-1 und den Bakteriophagen D6E und T7 zeigt, dass lediglich die Position 565 hochkonserviert vorliegt. Während die Position 544 funktionell-konserviert als positive Aminosäure in drei von fünf homologen Proteinen auftritt (s. Abb. 14).

Nach erfolgter Reinigung und Proteinbestimmung mit Hilfe eines Bradford-Assays<sup>80</sup>, werden die Proteinaustausch-Mutanten zusammen mit den Mutanten, welche hinsichtlich der Nuklease-Aktivität untersucht wurden, durch *in vitro* kolorimetrischen DNA-Bindungsuntersuchungen charakterisiert. Basierend auf der Interaktion der His<sub>6</sub>-markierten rekombinanten Proteine mit den immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen der 96 *well*-Mikrotiterplatte (Pierce® *Nickel Coated Plates*, Thermo Fisher Scientific GmbH,

## Diskussion

Schwerte) wird die Bindungsfähigkeit von biotinolytierte dsDNA charakterisiert. Als Positivkontrolle wird das Wildtyp-Protein pUL89 verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 20A dargestellt, während Abbildung 20B die Normierung der Ergebnisse abbildet. Die verwendete Methode bietet eine Vielzahl von Vorteilen bei der Untersuchung von DNA/ Protein-Interaktionen, zu diesen zählen eine schnellere Durchführung gegenüber anderen Methoden wie *Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA)* oder *DNA Pull-down* Versuchen. Weitere Vorteile liegen in der geringen, benötigten Protein-und DNA-Menge, des geringen Hintergrunds, der einfachen Quantifizierung mit Hilfe eines ELISA-Geräts, sowie der starken Interaktion zwischen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und His<sub>6</sub>-gekoppelten Proteinen. Ein entscheidender Faktor ist die Markierung mit Biotin, anstatt der Verwendung einer radioaktiven Methode<sup>84</sup>. Mit Hilfe dieser Untersuchungen zeigt sich, dass die Alanin-Austauschmutanten D463A (75 %), E534A (66 %), H565A (74 %) und H571A (65 %) ein ähnliches Bindungsverhalten aufweisen, wie das Wildtyp-Protein pUL89 (100%). Vergleichend zeigt die Mutation der Aminosäure D651 (137 %) einen verstärkenden Effekt auf die DNA-Bindung von pUL89D651A. Gegenüber diesen Ergebnissen führt der Austausch der Aminosäure R544 zu Alanin zu einer signifikanten Verringerung ( $\alpha = 0,05$ ) der DNA-Bindung auf 42 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein pUL89.



**Abbildung 35: Modellierter Struktur der DNA-Bindedomäne von pUL89.** Dargestellt sind das Ribbon-Modell des Gesamtproteins sowie die vergrößerte Struktur der ermittelten DNA-Bindedomäne mit modellierter DNA. Die Aminosäuren 580-600<sup>61</sup> welche essenziell für die Interaktion mit pUL56 sind, sind in Rot dargestellt. Zusätzlich zur DNA-Bindedomäne ist auch die Nuklease-Domäne räumlich-nah lokalisiert und wurde von Nadal et al.<sup>68</sup> in einem C-terminalen Konstrukt charakterisiert. Der Spaltungsprozess ist  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig ( $\text{Mg}^{2+}$  ist in Grün abgebildet) Im Gegensatz dazu konnte im Gesamtprotein D463 (Türkis) als essenzielle Nuklease-Aminosäure und R544 (Grün) als DNA-bindende Aminosäure identifiziert werden (entnommen aus: Theiß et al.<sup>98</sup>).

## Diskussion

Abbildung 35 zeigt die modellierte Struktur der DNA-Bindedomäne der Terminase-Untereinheit pUL89. Während links die Struktur des Gesamtproteins dargestellt ist, wurde im rechten Teil eine Vergrößerung der funktionellen Domäne abgebildet. Die Interaktionsdomäne<sup>61</sup> mit pUL56 ist in Rot dargestellt. Die charakterisierten Aminosäuren sind in Türkis (D463) und Grün (E534, R544, H565, H571) gekennzeichnet. Das Mg<sup>2+</sup>, wird durch eine grüne Kugel repräsentiert.

Bereits in einer Vielzahl von homologen Proteinen aus dsDNA-Bakteriophagen konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung über *Helix-Turn-Helix*-Motive vermittelt wird. So konnte in gpNu1 (Bakteriophage  $\lambda$ ) ein HTH-Motiv als essenziell für die DNA-Bindung identifiziert werden. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass in gpNU1 und in TerS-N15 (Bakteriophage N15) die DNA-Bindedomäne durch Dimerisierung der Terminase-Untereinheit gebildet wird<sup>130–132</sup>. Im Vergleich dazu zeigten verschiedene Studien das die DNA-Bindedomänen in den *pac* Bakteriophagen Sf6, P22 und SF6 als Monomere organisiert vorliegen<sup>133–135</sup>. Das Fehlen von Daten zu DNA-Bindedomänen in Herpesviren, erlaubte bisher keine Aussage über Ähnlichkeiten der Organisation zu Bakteriophagen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch einen ersten Hinweis darauf, dass in HCMV möglicherweise kein *Helix-Turn-Helix*-Motiv an der DNA-Bindung beteiligt ist.

### 5.3 Rekonstitution von rekombinanten HCMV in bakteriellen artifiziellen Chromosomen

Zur Bestätigung der *in vitro* Untersuchungen sollen rekombinante TB40/E-Virusmutanten mit Hilfe der *En Passant* Mutagenese erstellt, rekonstituiert und charakterisiert werden. Durch diese Mutagenese ist es möglich Mutationen in ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) über zwei Rekombinationsereignisse zu inserieren. Das Plasmid pEPkan-S, welches für eine Kanamycin-Resistenzkassette kodiert, wird als *Template* für die Mutagenese-PCR verwendet. Anschließend erfolgt die Transformation dieses PCR-Produkts in rekombinations- und elektrokompetente *E. coli* GS1783, sowie die Selektion anhand des Kanamycin-Resistenzgens. Der *E. coli* Stamm GS1783 besitzt das aus einem  $\alpha$ -Prophagen stammende *Red*-System welches eine Insertion von linearer dsDNA durch eine homologe Rekombination ermöglicht. Das *Red*-System besteht aus den Komponenten *Exo*, *Beta* und *Gam* und liegt unter Kontrolle eines temperatur-sensitiven Promotors in GS1783 vor. Ebenfalls wurde das Gen

## Diskussion

für die *I-SceI*-Endonuklease in diesen *E. coli*-Stamm inseriert. Die Expression dieser Endonuklease ist durch die Zugabe von L-Arabinose induzierbar und ermöglicht einen zweiten Rekombinationsvorgang, bei dem das Kanamycin-Resistenzgen aus dem BAC entfernt wird, während die eingefügte Mutation in das BAC inseriert wird<sup>74</sup>.

### 5.3.1 Rekonstitution und Charakterisierung der rekombinanten Viren

#### TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A

Die erfolgreiche Rekonstitution der BACs TB40/E, TB40/E\_UL89H565A, TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A ist in HELF Fi301-Zellen möglich und führt zur Ausbildung eines cytopathischen Effektes (CPE) in diesen Zellen. Die Mutationen H565A und H571A in *UL89* zeigen somit keinen Einfluss auf die Bildung infektiöser Virionen und ermöglichen dadurch eine weitere Charakterisierung dieser rekombinanten Viren. Zunächst wird eine zweistufige Wachstumskinetik mit den Virusmutanten und dem Wildtyp-Virus durchgeführt. Nach siebentägiger Inkubation erfolgt die Auszählung der CPE und die Ermittlung der spezifischen Wachstumseigenschaften (s. Abb. 23). Für die rekombinanten Histidin-Virusmutanten ergeben sich ähnliche Wachstumseigenschaften in HELF Fi301-Zellen wie bei dem Wildtyp-Virus TB40/E. Es zeigt sich, dass weder die Mutation von H565 oder H571, sowie die Doppelmutation einen signifikanten Einfluss auf die Virusvermehrung und Ausbreitung in der Zellkultur besitzen.

In Anschluss wird die virale Proteinexpression durch Western Blot-Analysen sowie indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Durch Western Blot-Analysen (s. Abb. 24) und indirekter Immunfluoreszenz (s. Abb. 25) können keine Unterschiede zum Wildtyp-Virus festgestellt werden. Es können in allen TB40/E-Virusmutanten die viralen Proteine IE1, pUL44, pUL89 und pUL99 mit einem ähnlichen Expressionslevel nachgewiesen werden. Diese viralen Proteine wurden gewählt, da sie die drei Hauptproteinklassen von HCMV repräsentieren. Die Proteinexpression von HCMV ist kaskadenartig organisiert<sup>136–138</sup>. Die erste Klasse bilden die sogenannten IE-Proteine (*immediate early*) dessen Expression mit der Infektion der Zielzelle startet und keine *de-novo*-Proteinsynthese benötigt<sup>139</sup>. Das Protein IE1 stellt dabei das erste exprimierte virale Protein da und ist bereits kurz nach Infektion einer Zelle nachweisbar. Anschließend werden die sogenannten E-Proteine (*early*), welche durch die IE-Proteine reguliert werden,

## Diskussion

nach einigen Stunden exprimiert. Zu diesen E-Proteinen zählt pUL44, eine Untereinheit der viralen DNA-Polymerase. PUL44 vermittelt die Prozessivität dieses viralen Enzyms<sup>100</sup>. Am Ende des Infektionszyklus wird die dritte Hauptproteinklasse exprimiert, die L –Proteine (*late*). Diese kodieren für virale Strukturproteine<sup>140</sup> und beinhalten die Proteine pUL89 und pUL99. Bei pUL89 handelt es sich um die Nuklease-Untereinheit des Terminase-Komplexes von HCMV, während der ORF *UL99* für ein Tegument-Protein kodiert<sup>141,142</sup>.

Ergänzend wird die Lokalisation von pUL89 in den Virusmutanten durch indirekte Immunfluoreszenz (s. Abb. 26) charakterisiert. Zur besseren Lokalisation wird eine zweite Immunfluoreszenz-Färbung mit  $\alpha$ -Lamin A+C durchgeführt. Lamin A+C ist ein nuklearer Marker und ist innerhalb der laminaren Matrix lokalisiert, welche assoziiert an der inneren Kernmembran vorliegt<sup>143</sup>. Das Protein pUL89 der HCMV-Terminase kann sowohl in TB40/E, als auch in den Virusmutanten, im Cytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde bereits früher beobachtet und deutet auf eine diffuse, cytoplasmatische Verbreitung von pUL89, während keine Terminase-Komplexierung stattfindet, hin<sup>56</sup>. Wie pUL89 in den Nukleus infizierter Zellen transportiert wird, wurde bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Jedoch scheinen die Proteine pUL56 und pUL51 am Import von pUL89 beteiligt zu sein. Während pUL89, allein exprimiert, nur im Cytoplasma nachgewiesen werden kann, führt die Koexpression von pUL56 (NLS, AA 816-827<sup>144</sup>) zu einer um 26% gesteigerten Präsenz von pUL89 im Nukleus. Die zusätzliche Expression von pUL51 führt zu einer Steigerung um 80%<sup>126</sup>. Ebenso wie die Wachstumskinetik zeigt auch die Untersuchung der Proteinexpression, dass die Histidin-Virusmutanten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Virus TB40/E aufweisen.

Die Fähigkeit der rekombinanten Virusmutanten konkatemere DNA zu spalten soll mit Hilfe einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) untersucht werden. Die PFGE bietet gegenüber einer normalen Agarosegelelektrophorese den Vorteil, dass es möglich ist sehr große DNA-Fragmente wie z. B. virale oder bakterielle DNA über das Anlegen elektrischer Impulse aufzutrennen. Diese Impulse wechseln in einem Winkel von je 60° zur Laufrichtung. Alle rekombinanten Viren zeigen eine Bande bei ca. 200 kb, bei der es sich um einzelne virale Genomeinheiten handelt (s. Abb. 27). Es kann somit nachgewiesen werden, dass die Histidin-Virusmutanten die Fähigkeit besitzen, virale konkatemere DNA zu spalten und somit eine DNA-Verpackung zu ermöglichen.

## Diskussion

Des Weiteren werden die DNA-Bindungseigenschaften der TB40/E-Virusmutanten durch *Pull-down*-Untersuchungen mit Kernextrakten infizierter HELF Fi301-Zellen untersucht. Mit Hilfe dieser Versuche, soll die Fähigkeit der dsDNA-Bindung der viralen Proteine nachgewiesen werden. Abbildung 28 stellt die Ergebnisse dieser DNA-Bindungsuntersuchungen dar. Im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen (s. Seite 79-80) werden keine gereinigten Proteine, sondern Kernextrakte infizierter HELF Fi301-Zellen eingesetzt. Diese *Pull-down* Untersuchungen zeigen, dass die Histidin-Mutationen keinen Einfluss auf die DNA-Bindung durch das Protein pUL89 aufweisen. Alle Extrakte der TB40/E-Virusmutanten zeigen eindeutig eine Bindungseigenschaft von Biotin-markierte dsDNA durch diese Terminase-Untereinheit. Diese Bindung konnte durch eine Hitzebehandlung für 5 min bei 95°C getrennt und pUL89 mit Hilfe des monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -pUL89 spezifisch in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wird der Kernextrakt von nicht-infizierten HELF Fi301-Zellen (*mock*) verwendet. In der Negativkontrolle kann keine pUL89-Bande in der *Output*-Fraktion beobachtet werden. Als Ladungskontrolle wird bei diesen *Pull-down*-Untersuchungen ein monoklonaler Antikörper gegen  $\alpha$ -Lamin A+C verwendet.

Der Einfluss der eingefügten Mutationen H565A und H571A in *UL89* auf strukturelle Veränderungen in den rekombinanten Viren wird mit Hilfe elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. Infizierte HELF Fi301-Zellen werden in Epon eingebettet, mit einem Ultramikrotom geschnitten und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Abbildung 29 stellt die morphologischen Aufnahmen des Wildtyp-Virus TB40/E dar, während in Abbildung 30 die Auswertungen der Histidin-Virusmutanten abgebildet sind. Es werden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Nukleus (Abb. 29A und 30A), des Cytoplasmas (Abb. 29B und 30B) und des extrazellulären Bereiches (Abb. 29C und 30C) durchgeführt. Im Nukleus können bei allen Viren drei verschiedene Kapsid-Varianten festgestellt werden. Diese Kapsidformen, welche als A-, B- und C-Kapside bezeichnet werden, sind charakteristisch für HCMV und wurden bereits im Jahr 1958 beobachtet<sup>145</sup>. Als B-Kapside (gelber Pfeil, s, Abb. 29 und 30) werden die Prokapside bezeichnet. Nach vollständiger DNA-Verpackung sowie Spaltung des *Scaffold* entstehen aus ihnen die reifen C-Kapside (grüner Pfeil). Diese reifen im weiteren Infektionsverlauf zu infektiösen Virionen. Im Vergleich zu den C-Kapside wurde die DNA-Verpackung in den A-Kapsiden (blauer Pfeil) nicht vollständig abgeschlossen bzw. liegt fehlerhaft vor<sup>29</sup>. Im Cytoplasma und extrazellulären Bereich der infizierten Zellen können bei allen Virusmutanten Virionen beobachtet werden. Des Weiteren

## Diskussion

können beim Wildtyp-Virus TB40/E und der Histidin-Mutante TB40/E\_UL89H571A sogenannte *dense bodies* festgestellt werden. Bei *dense bodies* handelt es sich um umhüllte Aggregate des Tegument-Protein pUL83, welche in Größe und Form heterogener sind als Virionen. *Dense bodies* enthalten keine virale DNA und sind nicht infektiös<sup>29,146</sup>. Es können jedoch keine *dense bodies* in den Virusmutanten TB40/E\_UL89H565A und TB40/E\_UL89H565A, H571A beobachtet werden. Neben Virionen und *dense bodies* treten *Non-infectious Virion-Like Particles* (NIEPs) als dritte Viruspartikel während einer Infektion auf. Während Virionen und *dense bodies* gut zu unterscheiden sind, ähneln NIEPs den Virionen strukturell sehr und unterscheiden sich lediglich durch das Protein pUL80, welches in Virionen fehlt. Ebenso wie *dense bodies* enthalten NIEPs keine virale DNA und werden durch die Umhüllung von A-Kapsiden gebildet<sup>29,147</sup>.

Abschließend wird die Genom-Integrität der rekombinanten Viren mit Hilfe einer *Next-Generation* Sequenzierung überprüft. Dazu wird die virale DNA der Passage 6 von infizierten HELF Fi301-Zellen isoliert und anschließend analysiert. Es zeigt sich, dass die durch die *En Passant* Mutagenese inserierten Mutationen im ORF *UL89* stabil im Genom vorliegen. Des Weiteren treten in den Viren TB40/E\_UL89H571A und TB40/E\_UL89H565A, H571A zusätzliche Mutationen in einer Intron-Region zwischen *US34A* und *RL1* auf. Die Funktion dieser beiden Gene ist bisher nicht eindeutig belegt. Einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass *US34* für eine Glykoproteinsignal-Sequenz kodiert<sup>148,149</sup>, während pRL1 möglicherweise an der Überwindung der Wirtsimmunität beteiligt ist<sup>150</sup>. 2015 konnte gezeigt werden, dass eine neutrale Selektion von Mutationen in dieser Region auftritt. Mutationen unterliegen somit nur einem mäßigen Selektionsdruck<sup>151</sup>. Bei der Passagierung von TB40/E in Fibroblasten treten gehäuft Mutationen im ORF *UL128L* auf. Das Genprodukt *UL128*, besteht aus den drei Exons im Bereich 208578-208794, 208911-209045, 209169-209332 des viralen Genoms. Jedoch wurden auch schon die Deletion von *US34A* in BAC-Konstrukten beobachtet, welche auf Fibroblasten propagiert wurden<sup>152</sup>, sodass das Auftreten der zusätzlichen Mutationen möglicherweise mit der Passagierung in fibroblastoiden Zellen im Zusammenhang steht.

Die Charakterisierung der Mutationen H565A und H571A durch rekombinante Viren zeigt, dass die Histidin-Aminosäuren keine essenzielle Funktion innerhalb des *UL89* ORF erfüllen. Während die übrigen getesteten Aminosäuren innerhalb der RNase H Faltung lokalisiert sind, gehören H565 und H571 zu einer flexiblen Coil-Region, welche

## Diskussion

diese Domäne umgibt. Es kann keine funktionelle Beteiligung dieser Aminosäuren an der DNA-Bindung oder Nuklease-Aktivität von pUL89 nachgewiesen werden.

### 5.3.2 Rekonstitutionsversuche der wachstums-defiziten BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A

Im Vergleich zu den Histidin-Mutationen zeigt sich, dass die Aminosäuren E534 und R544 eine essenzielle Funktion innerhalb der Nuklease pUL89 besitzen müssen. Die Mutation einer dieser beiden Aminosäuren bzw. die Doppelmutation zu Alanin führt zu einem Defekt in der Rekonstitution in HELF Fi301-Zellen. Diese Beobachtung unterstützt die *in vitro* kolorimetrischen DNA-Bindungsergebnisse, in denen R544 als essenzielle Aminosäure nachgewiesen werden konnte. Die Transfektion dieser wachstums-defiziten BACs in HELF Fi301 führt zu einer viralen Genexpression, welche über indirekte Immunfluoreszenz (s. Abb. 31) nachgewiesen werden konnte.

Die Komplementierung von Deletion in essenziellen viralen Proteinen mit Hilfe einer stabilen Zelllinie ist eine etablierte Methode und kam schon in mehreren Studien zur Anwendung<sup>153–155</sup>. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Zelllinien auf ihre Eignung zur Rekonstitution der wachstums-defiziten BAC-Konstrukte TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A getestet. Die Transfektion in HELF Fi301-UL89-Zellen, einer Zelllinie mit stabiler Expression von pUL89, führt jedoch zu keiner Virusrekonstitution und damit verbundener CPE-Ausbildung dieser Mutanten. In einer früheren Studie war die Rekonstitution einer Ex2-UL89-Deletionsmutanten nur durch die Kotransfektion der cDNA des ORFs *UL89* und der natürlichen, viralen Promotorregion erfolgreich<sup>61</sup>. Basierend auf dieser Studie wird eine weitere Zelllinie generiert, welche die cDNA von *UL89*, sowie den viralen Promotor, der dieses Protein im Virus reguliert, stabil exprimiert. Während die Zelllinie HELF Fi301-UL89 eindeutig eine pUL89-Expression im Western Blot zeigt, kann bei der neugenerierten Zelllinie HELF Fi301-vProm-UL89 keine Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 32). Während der ORF *UL89* in den HELF Fi301-UL89-Zellen unter der Kontrolle des CMV-IE1-Promotors vorliegt, wird dieses Gen in den HELF Fi301-vProm-UL89-Zellen durch den natürlichen Promotor reguliert. Trotz der nicht nachweisbaren Proteinexpression in diesen Zellen wird ein Rekonstitutionsversuch der wachstums-



## Diskussion

defiziten BACs unternommen. Aufgrund der kaskadenartigen Expression<sup>136–138</sup> der viralen Gene während einer HCMV-Infektion, könnte der Promotor des ORF *UL89* möglicherweise durch IE oder E-Gene reguliert wird. Folglich würde es erst im Verlauf einer Infektion zu einer Aktivierung des Promotors und damit verbunden zu einer Expression der Terminase-Untereinheit pUL89 in den HELF Fi301-Zellen kommen. Daher wäre ein Proteinnachweis in nicht transfizierten Zellen nicht möglich. Nach erfolgter Transfektion der BAC-Mutanten, sowie des Wildtyp-BACs TB40/E werden die Ansätze auf CPE-Ausbildung beobachtet. Während beim Wildtyp-Ansatz nach ungefähr zehn Tagen die Ausbildung eines CPE zu beobachten ist, tritt dieser in den BAC-Mutanten nicht auf.

Der Rekonstitutionsdefekt zeigt eindeutig, dass es sich bei E534 und R544 im ORF *UL89* um essenzielle, funktionelle Aminosäuren handelt. Ein Austausch einer dieser Aminosäuren führt zu einer Virusmutante, die nicht rekonstituiert werden kann. Bisher konnten nur Deletion in essenziellen Proteinen durch die Verwendung einer komplementierenden Zelllinie ausgeglichen werden<sup>153–155</sup>. So konnte durch eine Zelllinie, welche HCMV-gB (Glykoprotein B) stabil exprimiert, eine gB-Deletionsmutante rekonstituiert werden<sup>156</sup>. Aufgrund des Scheiterns der Komplementierung der BAC-Konstrukte TB40/E\_UL89E534A, TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A scheint diese Methode bei Punktmutationen keinen Erfolg aufzuweisen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von komplementierenden Zelllinien zu einem rekombinanten Virus führt, welches eine Deletion im jeweiligen Gen aufweist. Jedoch führt die Komplementation dazu, dass das Protein durch das von der Zelllinie zur Verfügung gestellte Wildtyp-Protein pseudotypisiert wird. Somit enthält das virale Genom die veränderte genetische Information. Die Funktion des Proteins im Virus wird jedoch durch das Wildtyp-Protein erfüllt<sup>156</sup>.

### 6. Ausblick

Die Problematik der Rekonstitution von BAC-Konstrukten mit Mutationen essenzieller Aminosäuren stellt die weitere Charakterisierung der funktionellen Domänen dieses Proteins vor eine große Herausforderung. Die Komplementierung der BAC-Mutanten TB40/E\_UL89E534A; TB40/E\_UL89R544A und TB40/E\_UL89E534A, R544A war in den verwendeten Zelllinien HELF Fi301, HELF Fi301-UL89 und HELF Fi301-vProm-UL89 nicht erfolgreich. Vermutlich würde auch eine Mutation in der Nuklease-Aminosäure D463 zu einem wachstums-defiziten BAC-Konstrukt führen. Zur weiteren Untersuchung dieser funktionellen Aminosäuren muss diese Problematik zunächst überwunden werden. Aufgrund der Tatsache das bisher nur die Rekonstitution von Deletionsmutanten mit komplementieren Zelllinien erfolgreich war, stellt die Konstruktion einer derartigen Mutante einen erfolgsversprechenden Ansatz dar. Die Nähe von E534 und R544 ermöglicht die Generierung einer Mutante mit einer Deletion von minimal elf Aminosäuren. Neben der Verwendung einer Deletionsmutante, bietet sich eine Fusion von *UL89* mit einer regulierbaren FKBP-Destabilisierungsdomäne als Alternative an. Ohne Bindung des Liganden kommt es zu einer schnellen proteasomalen Degradation des Zielproteins, während es in Anwesenheit des Liganden akkumuliert und ein Expressionslevel wie im Wildtyp aufweist. Diese Methode wurde bereits in einer Vielzahl von Studien zur Untersuchung essenzieller viraler Proteine angewendet<sup>157–159</sup>. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung dieser essenziellen Aminosäuren wäre eine Einzelpartikel-Analyse von Baculovirus-exprimierten Protein unter der Zugabe von dsDNA. Möglicherweise könnte die DNA-Bindedomäne von pUL89 näher charakterisiert sowie der Einfluss der Aminosäuren R544 und E534 auf die Funktion des Proteins untersucht werden.

Neben den funktionellen Domänen für DNA-Bindung und Nuklease-Aktivität, weist pUL89 eine weitere essenzielle Domäne für die Interaktion mit der Terminase-Untereinheit pUL56 auf. Diese Interaktionsdomäne konnte bereits in einer früheren Studie<sup>61</sup> identifiziert werden und umfasst die Aminosäuren 580-600. Eine weitere Analyse dieser Domäne durch die Konstruktion von BAC-Mutanten könnte nähere Einblicke in die Komplexierung der Terminaseproteine liefern. Des Weiteren ist die Koexpression der drei Untereinheiten pUL51, pUL56 und pUL89, sowie die Aufklärung der Stöchiometrie dieses Komplexes von entscheidender Bedeutung, für die weitere Untersuchung des DNA-Verpackungsprozesses in HCMV.

### LITERATURVERZEICHNIS

1. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1991;14(2):63-79.
2. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson a C, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425-449.
3. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE. Fields Virology. In: *Antiviral Therapy*. Vol 2. ; 2001.
4. Bello C, Whittle H. Cytomegalovirus infection in Gambian mothers and their babies. *J Clin Pathol*. 1991;44(5):366-369.
5. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006;43(9):1143-1151.
6. Simpson RJ, Bigley AB, Spielmann G, LaVoy ECP, Kunz H, Bollard CM. Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2016;22:8-27.
7. McIntosh M, Hauschild B, Miller V. Human cytomegalovirus and transplantation : drug development and regulatory issues. *J Virus Erad*. 2016;2(3):143-148.
8. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*. 2007;17(4):253-276.
9. Ludwig A, Hengel H. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill*. 2009;14(9):26-32.
10. Wilkens H, Sester M. Treatment of Cytomegalovirus Infection with Cidofovir and CMV Immune Globulin in a Lung Transplant Recipient. *Case Rep Transplant*. 2016;2016:4560745-4560749.
11. Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med*. 1996;335(10):721-729.
12. Curran M, Noble S. Valganciclovir. *Drugs*. 2001;61(8):1145-1150.
13. Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ. Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir Chem Chemother*. 1996;7(3):115-127.
14. Chrisp P, Clissold SP. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs*. 1991;41(1):104-129.
15. Chen K, Cheng MP, Hammond SP, Einsele H, Marty FM. Antiviral prophylaxis for

## Literaturverzeichnis

- cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* 2018;2(16):2159-2175.
16. Lischka P, Michel D, Zimmermann H. Characterization of cytomegalovirus breakthrough events in a phase 2 prophylaxis trial of letermovir (AIC246, MK 8228). *J Infect Dis.* 2016;213(1):23-30.
  17. Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res.* 2017;148:1-4.
  18. Chou S. Rapid in vitro evolution of human cytomegalovirus UL56 mutations that confer letermovir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6588-6593.
  19. O'Brien MS, Markovich KC, Selleseth D, DeVita A V., Sethna P, Gentry BG. In vitro evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 2018;158:255-263.
  20. Evers DL, Komazin G, Shin D, Hwang DD, Townsend LB, Drach JC. Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 2002;56(1):61-72.
  21. Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, et al. Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine.* 2013;32(1):4-10.
  22. Gerna G, Lilleri D. Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: Development of a protective HCMV vaccine. *New Microbiol.* 2019;42(1):1-20.
  23. Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, et al. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol.* 2003;77(15):8541-8547.
  24. Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol.* 2002;12(2):115-127.
  25. Karlin S, Mocarski ES, Schachtel GA. Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *J Virol.* 1994;68(3):1886-1902.
  26. Murphy E. Human Cytomegalovirus Genome. In: Shenk TE, Stinski MF, eds. *Human Cytomegalovirus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008:1-19.
  27. Köppen-Rung P, Dittmer A, Bogner E. Intracellular Distribution of Capsid-Associated pUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and pUL93. *J Virol.* 2016;90(13):5876-5885.
  28. Meissner CS, Köppen-Rung P, Dittmer A, Lapp S, Bogner E. A "coiled-coil" motif is important for oligomerization and DNA binding properties of human cytomegalovirus protein UL77. *PLoS One.* 2011;6(10):1-12.
  29. Gibson W, Bogner E. *Morphogenesis of the Cytomegalovirus Virion and*

## Literaturverzeichnis

- Subvirus Particles. In Cytomegaloviruses From Mol Pathog to Interv.* 2 nd. (Reddehase M, ed.). Norfolk: Caister Academic Press.; 2013.
30. Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol.* 2004;65(5):395-402.
  31. Dunn W, Trang P, Zhong Q, Yang E, van Belle C, Liu F. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol.* 2005;7(11):1684-1695.
  32. Cohen Y, Stern-Ginossar N. Manipulation of host pathways by human cytomegalovirus: Insights from genome-wide studies. *Semin Immunopathol.* 2014;36(6):651-658.
  33. Bogner E, Anheier B, Öffner F, et al. Nuclear translocation of mutagenized forms of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55). *J Gen Virol.* 1997;78(7):1647-1651.
  34. Huber MT, Compton T. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol.* 1998;72(10):8191-8197.
  35. Reschke M, Reis B, Noding K, et al. Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J Gen Virol.* 1995;76(1):113-122.
  36. Wang X, Huang DY, Huong S-M, Huang E-S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* 2005;11(5):515-521.
  37. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* 2003;424(6947):456–461.
  38. Stegmann C, Hochdorfer D, Lieber D, et al. A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):1-27.
  39. McVoy M a, Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol.* 1994;68(2):1040-1051.
  40. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4922-4931.
  41. Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology.* 1996;224(1):150-160.
  42. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. Accumulation of virion tegument and

## Literaturverzeichnis

- envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol.* 2000;74(2):975-986.
43. Schauflinger M, Villinger C, Mertens T, Walther P, von Einem J. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cell Microbiol.* 2013;15(2):305-314.
  44. Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, et al. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol.* 1996;141(3-4):557-572.
  45. Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation Ritesh. *Trends Microbiol.* 2012;20(8):392-401.
  46. Baker ML, Jiang W, Rixon FJ, Chiu W. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol.* 2005;79(23):14967-14970.
  47. Black LW. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu Rev Microbiol.* 1989;43:267-292.
  48. Mitchell MS, Matsuzaki S, Imai S, Rao VB. Sequence analysis of bacteriophage T4 DNA packaging/terminase genes 16 and 17 reveals a common ATPase center in the large subunit of viral terminases. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(18):4009-4021.
  49. Bogner E, Reschke M, Reis B, Mockenhaupt T, Radsak K. Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome. *Virology.* 1993;196(1):290-293.
  50. Bogner E, Radsak K, Stinski MF. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol.* 1998;72(3):2259-2264.
  51. Spaete RR, Mocarski ES. The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J Virol.* 1985;54(3):817-824.
  52. Bogner E. Human cytomegalovirus packaging: an update on structure–function relationships Elke. *Future Virol.* 2010;5(4):397-404.
  53. Hwang JS, Bogner E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem.* 2002;277(9):6943-6948.
  54. Scholz B, Rechter S, Drach JC, Townsend LB, Bogner E. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(5):1426-1433.
  55. Scheffczik H, Savva CGW, Holzenburg A, Kolesnikova L, Bogner E. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.*

## Literaturverzeichnis

2002;30(7):1695-1703.

56. Borst EM, Kleine-Albers J, Gabaev I, et al. The human cytomegalovirus UL51 protein is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89. *J Virol.* 2013;87(3):1720-1732.
57. Dittmer A, Bogner E. Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein PUL104. *Biochemistry.* 2005;44(2):759-765.
58. Dittmer A, Drach JC, Townsend LB, Fischer A, Bogner E. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *J Virol.* 2005;79(23):14660-14667.
59. Holzenburg A, Dittmer A, Bogner E. Assembly of monomeric human cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J Gen Virol.* 2009;90(10):2381-2385.
60. Morita M, Tasaka M, Fujisawa H. DNA packaging ATPase of bacteriophage T3. *Virology.* 1993;193(2):748-752.
61. Thoma C, Borst E, Messerle M, Rieger M, Hwang J, Bogner E. Identification of the Interaction Domain of the Small Terminase Subunit pUL89 with the Large Subunit pUL56 of Human Cytomegalovirus. *Biochemistry.* 2006;45(29):8855-8863.
62. Thoma C. Characterization of the DNA binding ability of the HCMV terminase subunit pUL89. In: Nürnberg; 2007.
63. Addison C, Rixon FJ, Preston VG. Herpes simplex virus type 1 UL28 gene product is important for the formation of mature capsids. *J Gen Virol.* 1990;71(10):2377-2384.
64. Visalli M a., House BL, Lahrman FJ, Visalli RJ. Intermolecular Complementation between Two Varicella-Zoster Virus pORF30 Terminase Domains Essential for DNA Encapsidation. *J Virol.* 2015;89(19):10010-10022.
65. Giesen K, Radsak K, Bogner E. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus , pUL56 , is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin  $\alpha$ . *J Gen Virol.* 2000;81(9):2231-2244.
66. Ligat G, Jacquet C, Chou S, Couvreur A, Alain S, Hantz S. Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-8.
67. Savva CGW, Holzenburg A, Bogner E. Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett.* 2004;563(1-3):135-140.
68. Nadal M, Mas PJP, Blanco AGA, et al. Structure and inhibition of herpesvirus

## Literaturverzeichnis

- DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(39):16078-16083.
69. Selvarajan Sigamani S, Zhao H, Kamau YN, Baines JD, Tang L. The structure of the herpes simplex virus DNA-packaging terminase pUL15 nuclease domain suggests an evolutionary lineage among eukaryotic and prokaryotic viruses. *J Virol*. 2013;87(12):7140-7148.
70. Graham FL, van der Eb a. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52(2):456-467.
71. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014;5(11):4767-4778.
72. Sinzger C, Hahn G, Digel M, et al. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 2):359-368.
73. Chen J, Li Y, Zhang K, Wang H. Whole-Genome Sequence of Phage-Resistant Strain Escherichia coli DH5 $\alpha$ . *Genome Announc*. 2018;6(10):1-2.
74. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al. The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science*. 1997;277(5331):1453-1462.
75. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System. In: Braman J, ed. *In Vitro Mutagenesis Protocols*. 3th ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2010:421-430.
76. Tischer BK, Von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step Red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *Biotechniques*. 2006;40(2):191-197.
77. Drouot E, Piret J, Boivin G. Novel Method Based on “En Passant” Mutagenesis Coupled with a Gaussia Luciferase Reporter Assay for Studying the Combined Effects of Human Cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3216-3224.
78. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-5467.
79. Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. In: DiStefano JK, ed. *Disease Gene Identification: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, New York, NY; 2018:223-232.
80. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254.
81. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.



## Literaturverzeichnis

- Anal Biochem.* 1987;166(2):368-379.
82. Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 1995;16(1):948-951.
  83. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16-22.
  84. Banasik M, Sachadyn P. A Colorimetric Microplate Assay for DNA-Binding Activity of His-Tagged MutS Protein. *Mol Biotechnol.* 2016;58(8-9):521-527.
  85. Hwang S, Guo Z, Kuznetsov IB. DP-Bind: A web server for sequence-based prediction of DNA-binding residues in DNA-binding proteins. *Bioinformatics.* 2007;23(5):634-636.
  86. Mandell JG, Barbas III CF. Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:516-523.
  87. Narasimhan G, Bu C, Gao Y, Wang X, Xu N, Mathee K. Mining protein sequences for motifs. *J Comput Biol.* 2002;9(5):707-720.
  88. Dodd IB, Egan JB. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(17):5019-5026.
  89. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 2000;16(4):404-405.
  90. Kelley LA, Mezulis S, Yates C, Wass M, Sternberg M. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845-858.
  91. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612.
  92. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874.
  93. Eom KS, Cheong JS, Lee SJ. Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific Interactions with DNA. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;26(12):2019-2029.
  94. Si J, Zhao R, Wu R. An overview of the prediction of protein DNA-binding sites. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5194-5215.
  95. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 1999;292(2):195-202.
  96. Jones DT. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol.* 1999;287(4):797-815.
  97. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. A Model Recognition Approach to the Prediction of All-Helical Membrane Protein Structure and Topology.

## Literaturverzeichnis

- Biochemistry*. 1994;33(10):3038-3049.
98. Theiß J, Sung MW, Holzenburg A, Bogner E. Full-length human cytomegalovirus terminase pUL89 adopts a two-domain structure specific for DNA packaging. *PLoS Pathog*. 2019;15(12):1-20.
  99. Rao VB, Feiss M. Mechanisms of DNA Packaging by Large Double-Stranded DNA Viruses. *Annu Rev Virol*. 2015;9(2):351-378.
  100. Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, et al. Herpes Simplex Virus DNA Cleavage and Packaging Proteins Associate with the Procapsid prior to Its Maturation Herpes Simplex Virus DNA Cleavage and Packaging Proteins Associate with the Procapsid prior to Its Maturation. *J Virol*. 2001;75(2):687-698.
  101. Sun S, Kondabagil K, Draper B, et al. The structure of the phage T4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatic forces. *Cell*. 2008;135(7):1251-1262.
  102. Xu R-G, Jenkins HT, Antson AA, Greive SJ. Structure of the large terminase from a hyperthermophilic virus reveals a unique mechanism for oligomerization and ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(22):13029-13042.
  103. Hilbert BJ, Hayes JA, Stone NP, Duffy CM, Sankaran B, Kelch BA. Structure and mechanism of the ATPase that powers viral genome packaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(29):3792-3799.
  104. Zhao H, Christensen TE, Kamau YN, Tang L. Structures of the phage Sf6 large terminase provide new insights into DNA translocation and cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(20):8075-8080.
  105. Yang Y, Yang P, Wang N, et al. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation. *Protein Cell*. 2020;11(5):339-351.
  106. Nowotny M, Gaidamakov SA, Ghirlando R, Cerritelli SM, Crouch RJ, Yang W. Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription. *Mol Cell*. 2007;28(2):264-276.
  107. Ma B-G, Chen L, Ji H-F, et al. Characters of very ancient proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(3):607-611.
  108. Rice PA, Baker TA. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nat Struct Biol*. 2001;8(4):302-307.
  109. Ariyoshi M, Vassilyev DG, Iwasaki H, Nakamura H, Shinagawa H, Morikawa K. Atomic structure of the RuvC resolvase: a holliday junction-specific endonuclease from E. coli. *Cell*. 1994;78(6):1063-1072.
  110. Parker JS, Roe SM, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*. 2004;23(24):4727-4737.

## Literaturverzeichnis

111. Song J-J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 2004;305(5689):1434-1437.
112. Zuo Y, Deutscher MP. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(5):1017-1026.
113. Pena V, Rozov A, Fabrizio P, Lührmann R, Wahl MC. Structure and function of an RNase H domain at the heart of the spliceosome. *EMBO J*. 2008;27(21):2929-2940.
114. Maluf NK, Yang Q, Catalano CE. Self-association properties of the bacteriophage lambda terminase holoenzyme: implications for the DNA packaging motor. *J Mol Biol*. 2005;347(3):523-542.
115. Maluf NK, Gaussier H, Bogner E, Feiss M, Catalano CE. Assembly of Bacteriophage Lambda Terminase into a Viral DNA Maturation and Packaging Machine. *Biochemistry*. 2006;45(51):15259-15268.
116. Al-Zahrani AS, Kondabagil K, Gao S, Kelly N, Ghosh-Kumar M, Rao VB. The small terminase, gp16, of bacteriophage T4 is a regulator of the DNA packaging motor. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24490-24500.
117. Loredó-Varela J, Chechik M, Levnikov VM, et al. The putative small terminase from the thermophilic dsDNA bacteriophage G20C is a nine-subunit oligomer. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(Pt 8):876-879.
118. Ren B, Pham TM, Surjadi R, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lactococcal bacteriophage small terminase subunit. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(Pt 3):275-279.
119. Knoblauch M. Charakterisierung der HCMV Terminase-Untereinheiten pUL56 und pUL89: Effekte nach Co-Expression mittels rekombinanter Baculoviren. 2019.
120. Neuber S, Wagner K, Messerle M, Borst EM. The C-terminal part of the human cytomegalovirus terminase subunit pUL51 is central for terminase complex assembly. *J Gen Virol*. 2018;99(1):119-134.
121. Neuber S, Wagner K, Goldner T, et al. Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus Terminase Subunits pUL51, pUL56, and pUL89 Promotes Terminase Complex Formation. *J Virol*. 2017;91(12):1-18.
122. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 1975;258(5536):598-599.
123. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, et al. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. In: Burgess RR, Deutscher MPBT-M in E, eds. *Guide to Protein Purification*. Vol 463. 2nd ed. Academic Press; 2009:439-473.

## Literaturverzeichnis

124. Xu R-G, Jenkins HT, Chechik M, et al. Viral genome packaging terminase cleaves DNA using the canonical RuvC-like two-metal catalysis mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(6):3580-3590.
125. Zhao H, Lin Z, Lynn AY, et al. Two distinct modes of metal ion binding in the nuclease active site of a viral DNA-packaging terminase: insight into the two-metal-ion catalytic mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(22):11003-11016.
126. Yang L, Yang Q, Wang M, et al. Terminase large subunit provides a new drug target for herpesvirus treatment. *Viruses.* 2019;11(3):1-18.
127. Underwood MR, Harvey RJ, Stanat SC, et al. Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J Virol.* 1998;72(1):717-725.
128. Krosky PM, Underwood MR, Turk SR, et al. Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J Virol.* 1998;72(6):4721-4728.
129. Mitchell MS, Rao VB. Functional analysis of the bacteriophage T4 DNA-packaging ATPase motor. *J Biol Chem.* 2006;281(1):518-527.
130. de Beer T, Fang J, Ortega M, et al. Insights into specific DNA recognition during the assembly of a viral genome packaging machine. *Mol Cell.* 2002;9(5):981-991.
131. Shinder G, Gold M. The Nul subunit of bacteriophage lambda terminase binds to specific sites in cos DNA. *J Virol.* 1988;62(2):387-392.
132. Feiss M, Geyer H, Klingberg F, et al. Novel DNA packaging recognition in the unusual bacteriophage N15. *Virology.* 2015;482:260-268.
133. Zhao H, Finch CJ, Sequeira RD, et al. Crystal structure of the DNA-recognition component of the bacterial virus Sf6 genome-packaging machine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):1971-1976.
134. Büttner CR, Chechik M, Ortiz-Lombardía M, et al. Structural basis for DNA recognition and loading into a viral packaging motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(3):811-816.
135. Roy A, Bhardwaj A, Datta P, Lander GC, Cingolani G. Small terminase couples viral DNA binding to genome-packaging ATPase activity. *Structure.* 2012;20(8):1403-1413.
136. Stinski MF, Isomura H. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol.* 2008;197(2):223-231.
137. Torres L, Tang Q. Immediate-Early (IE) gene regulation of cytomegalovirus: IE1- and pp71-mediated viral strategies against cellular defenses. *Viol Sin.* 2014;29(6):343-352.

## Literaturverzeichnis

138. Nevels M, Paulus C, Shenk T. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17234-17239.
139. Tenney DJ, Colberg-Poley AM. Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. *J Virol*. 1991;65(12):6724-6734.
140. McWatters BJP, Stenberg RM, Kerry JA. Characterization of the Human Cytomegalovirus UL75 (Glycoprotein H) Late Gene Promoter. *Virology*. 2002;303(2):309-316.
141. Demarchi JM. Human cytomegalovirus DNA: Restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs. *Virology*. 1981;114(1):23-38.
142. Stinski MF, Thomsen DR, Stenberg RM, Goldstein LC. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol*. 1983;46(1):1-14.
143. Koncicka M, Cervenka J, Jahn D, et al. Expression of lamin C2 in mammalian oocytes. *PLoS One*. 2020;15(4):1-15.
144. Giesen K, Radsak K, Bogner E. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus , pUL56 , is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin  $\alpha$ . *J Gen Viro*. 2000;81(9):2231-2244.
145. Luse SA, Smith MG. Electron Microscopy of Salivary Gland Viruses. *J Exp Med*. 1958;107(5):623-632.
146. McGavran MH, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol*. 1965;4(1):1-10.
147. Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. 1983;130(1):118-133.
148. Scott GM, Barrell BG, Oram J, Rawlinson WD. Characterisation of transcripts from the human cytomegalovirus genes TRI7, UL20a, UL36, UL65, UL94, US3 and US34. *Virus Genes*. 2002;24(1):39-48.
149. Chee MS, Bankier AT, Beck S, et al. Analysis of the Protein-Coding Content of the Sequence of Human Cytomegalovirus Strain AD169 BT Cytomegaloviruses. In: McDougall JK, ed. *Cytomegaloviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990:125-169.
150. Le-Trilling VTK, Becker T, Nachshon A, et al. The Human Cytomegalovirus pUL145 Isoforms Act as Viral DDB1-Cullin-Associated Factors to Instruct Host

## Literaturverzeichnis

- Protein Degradation to Impede Innate Immunity. *Cell Rep.* 2020;30(7):2248-2260.
151. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, et al. High-Throughput Analysis of Human Cytomegalovirus Genome Diversity Highlights the Widespread Occurrence of Gene-Disrupting Mutations and Pervasive Recombination. *J Virol.* 2015;89(15):7673-7695.
  152. Murrell I, Wilkie GS, Davison AJ, et al. Genetic Stability of Bacterial Artificial Chromosome-Derived Human Cytomegalovirus during Culture In Vitro. *J Virol.* 2016;90(8):3929-3943.
  153. Peng C, Chen J, Tang W, Liu C, Chen X. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF6 gene is essential in viral lytic replication. *PLoS One.* 2014;9(6):1-9.
  154. Visalli MA, House BL, Selariu A, Zhu H, Visalli RJ. The varicella-zoster virus portal protein is essential for cleavage and packaging of viral DNA. *J Virol.* 2014;88(14):7973-7986.
  155. Strive T, Borst E, Messerle M, Radsak K. Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B is dispensable for viral growth in culture. *J Virol.* 2002;76(3):1252-1264.
  156. Isaacson MK, Compton T. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is Required for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread but Not for Virion Attachment, Assembly, or Egress. *J Virol.* 2009;83(8):3891-3903.
  157. Tandon R, Mocarski ES. Cytomegalovirus pUL96 is critical for the stability of pp150-associated nucleocapsids. *J Virol.* 2011;85(14):7129-7141.
  158. Qian Z, Leung-Pineda V, Xuan B, Piwnicka-Worms H, Yu D. Human Cytomegalovirus Protein pUL117 Targets the Mini-Chromosome Maintenance Complex and Suppresses Cellular DNA Synthesis. *PLOS Pathog.* 2010;6(3):1-14.
  159. Perng Y-C, Qian Z, Fehr AR, Xuan B, Yu D. The human cytomegalovirus gene UL79 is required for the accumulation of late viral transcripts. *J Virol.* 2011;85(10):4841-4852.

## Anhang

### ANHANG

Tabelle 26: Zusammenfassung des IUPAC Nukleotid-Codes

IUPAC Nukleotid-Code	Nukleinbase
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T/ U	Thymin/ Uracil
R	Adenin/ Guanin
Y	Cytosin/ Thymin
S	Guanin/ Cytosin
W	Adenin/ Thymin
K	Guanin/ Thymin
M	Adenin/ Cytosin
B	Cytosin/ Guanin/ Thymin
D	Adenin/ Guanin/ Thymin
H	Adenin/ Cytosin/ Thymin
V	Adenin/ Cytosin/ Guanin
N	jede Nukleinbase
./-	Lücke

Tabelle 27: Ergebnisse der NGS-Analyse der Intron-Region zwischen *US34A* und *RL1*.

Num- mer	Posi- tion	orig. Nukle- inbase	TB40/E	TB40/E_UL89 H565A	TB40/E_UL89 H571A	TB40/E_UL89 H565A, H571A
<b>Intron-Region</b>						
1	33795	C	C	C	G	C
2	33802	C	C	C	G	C
3	33807	C	C	N	G	C
4	33808	A	A	N	G	A
5	33812	C	C	N	G	C
6	33822	T	T	N	G	T
7	33824	T	T	N	G	T
8	33826	T	T	N	G	T
9	33828	C	C	N	G	C
10	33829	A	A	N	G	A
11	33836	T	T	N	G	T
12	33837	T	T	N	G	T
13	33839	C	C	N	G	C
14	33850	C	C	N	G	C
15	33861	T	T	N	G	K
16	33863	T	T	N	G	K
17	33871	T	T	N	G	K
18	33875	T	T	N	G	K
19	33882	A	A	N	G	R
20	33884	C	C	N	G	S
21	33887	T	T	N	G	K
22	33889	T	T	N	G	K
23	33890	C	C	N	G	S
24	33891	C	C	N	G	S
25	33892	T	T	N	G	K
26	33893	C	C	N	G	S
27	33894	A	A	N	G	R
28	33896	C	C	N	G	N
29	33898	C	C	N	G	N
30	33900	T	T	N	G	N
31	33901	T	T	N	G	N
32	33902	T	T	N	G	N

## Anhang

33	33904	C	C	N	G	N
34	33907	C	C	N	G	N
35	33911	C	C	N	G	N
36	33914	T	T	N	G	N
37	33916	T	T	N	G	N
38	33917	C	C	N	G	G
39	33918	C	C	N	G	N
40	33921	C	C	N	G	G
41	33923	C	C	N	G	N
42	33924	T	T	N	G	N
43	33925	T	T	N	G	G
44	33926	T	T	N	G	N
45	33928	T	T	N	G	G
46	33930	C	C	N	G	N
47	33934	A	A	N	G	R
48	33935	C	C	N	G	N
49	33938	C	C	N	G	G
50	33939	C	C	N	G	G
<b>ORF UL89</b>						
51	166483	T	T	T	G	G
52	166484	G	G	G	C	C
53	166501	T	T	G	T	K
54	166502	G	G	C	G	S

Die aufgetretenen Mutationen wurden farblich markiert. Während grün für die originale Nukleotidsequenz-Folge steht, wurden die eingefügten Mutationen mit blau gekennzeichnet (im ORF *UL89*). Die gelbe Markierung symbolisiert den nicht sequenzierten bzw. nicht auswertbaren Abschnitt der viralen Geome (IUPAC Code = N). Während die zusätzlichen Mutationen durch rot gekennzeichnet sind.



### PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

#### Peer Review-Journal

Janine Theiß, Min Woo Sung, Andreas Holzenburg, Elke Bogner. Full-length human cytomegalovirus terminase pUL89 adopts a two-domain structure specific for DNA packaging. *PLoS Pathog.* 2019;15(12):1-20.

#### Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen

Janine Theiß, Min Woo Sung, Andreas Holzenburg, Elke Bogner. Nuclease and DNA binding domains of human cytomegalovirus terminase subunit pUL89. Poster Präsentation bei der Jahrestagung der Virologie. Würzburg, Deutschland (2018).

Janine Theiß, Min Woo Sung, Andreas Holzenburg, Elke Bogner. Human cytomegalovirus terminase subunit pUL89 adopt a novel structure specific for DNA binding and cleavage. Poster Präsentation bei dem International Herpesvirus Workshop, Vancouver, Kanada (2018).

Janine Theiß, Barbara Vetter, Lüder Wiebusch, Elke Bogner. Growth defects in *UL89* mutants of human cytomegalovirus TB40/E BAC 4. Poster Präsentation bei der Jahrestagung der Virologie, Düsseldorf, Deutschland (2019).

Janine Theiß, Barbara Vetter, Lüder Wiebusch, Elke Bogner. DNA binding of the terminase subunit pUL89 of Human Cytomegalovirus (HCMV). Poster Präsentation bei dem International Herpesvirus Workshop, Knoxville, USA (2019).

Janine Theiß, Barbara Vetter, Lüder Wiebusch, Elke Bogner DNA binding of the terminase subunit pUL89 of Human Cytomegalovirus (HCMV). Poster Präsentation bei dem Mini-Herpesvirus-Workshop, Braunschweig, Deutschland (2019).

## **Danksagung**

### **DANKSAGUNG**

Zunächst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Elke Bogner, für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe sowie das spannende Thema, bedanken.

Des Weiteren möchte ich bei Professor Dr. Detlev Krüger und Professor Dr. Christian Drosten für die Aufnahme am Institut für Virologie, der Charité-Universitätsmedizin Berlin (CCM) bedanken. Mein Dank gilt dem gesamten Institut für Virologie, insbesondere der Arbeitsgruppe Replikationsmechanismen von Herpesviren, für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Christina Priemer für ihre Unterstützung in der Kultivierung der Zellzucht bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Professoren Christian Sinzger, Thomas Eitingen und Christian Schmitz-Linneweber für ihre Bereitschaft Teil der Promotionskommission zu sein, sowie Prof. Dr. Andreas Herrmann für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation im Fachbereich Biologie, der Humboldt-Universität zu Berlin.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Pädiatrische Molekularbiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin (CVK), insbesondere bei Dr. Lüder Wiebusch für die Hilfe und Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen ehemaligen Kommilitoninnen, Frau Annika Hoffmann, Frau Giovanna Ranzini und Frau Navpreet Kaur, für die fachlichen Diskussionen, die Unterstützung und Freundschaft während unserer Studien- und Promotionszeit.

Einen großen Dank gilt meinem Lebensgefährten, Herrn Martin Friedrichs, für das kritische Korrekturlesen dieser Dissertation, sowie für die unterstützenden Worte, Gesten und seinen unerschütterlichen Glauben an mich in den letzten Jahren.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter, Frau Angelika Theiß, für ihre fortwährende und unermüdliche Unterstützung während meiner gesamten schulischen und akademischen Ausbildung bedanken.

### **EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Strukturelle Einblicke in die Funktionalität des Terminase-Proteins pUL89, eine Untereinheit des Nanomotors des humanen Cytomegalievirus (HCMV).“ erstmalig einreiche, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 26.05.2020,

Janine Theiß

Allen Grafiken und Fotografien ohne Quellenangabe wurden selbst erstellt.